

Rutiinimenetelmillä ja Vitek2-laitteella saatujen tulosten vertailu bakteerien identifikaatio- ja antibioottiherkkyystutkimuksissa

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
13.11.2006

Marika Järveläinen
Iira Roslund
Maarit Silander

Kiitokset

HUSLAB

mikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi
laboratoriohoitaja Risto Hilla

bioMérieux Suomi Oy
tuotespesialisti Juha Miller

Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Järveläinen Marika, Roslund Ira ja Silander Maarit			
Työn nimi			
Rutiinimenetelmillä ja Vitek2-laitteella saatujen tulosten vertailu bakteerien identifikaatio- ja antibioottilherkkyystutkimuksissa			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syksy 2006	92 + 3 liitettä	
TIIVISTELMÄ			
<p>Nykyään bakteerien identifikaatio- ja antibioottilherkkyysmääritykset tehdään kliinisen mikrobiologian laboratorioissa suurimmaksi osaksi manuaalisesti. Näytemäärät ovat lisääntyneet bakteriologian laboratorioissa, ja siksi diagnostiikan automatisointi on tullut tarpeelliseksi. BioMérieux on kehittänyt Vitek2-laitteen, jolla voidaan tehdä bakteerien ja sienien identifikaatio- ja antibioottilherkkyysmäärityksiä.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata rutiinimenetelmien ja Vitek2-laitteen identifikaatio- ja antibioottilherkkyystuloksia. Yksittäisiä vertailtavia kohteita olivat testireaktiot, ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) -ominaisuus ja määrityksiin kulunut aika. HUSLABin toimeksiannosta Vitek2-laitteella tutkittiin ESBL-kantoja sekä rutiinimenetelmillä vaikeasti tunnistettavia nonfermentatiivisia sauvabakteereja ja kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja. Laitetta varten on kehitetty uusia testikortteja, jotka tunnistavat näitä bakteerikantoja.</p> <p>Aikaisemmat identifikaatio-, reaktio- ja antibioottilherkkyystulokset kerättiin HUSLABin potilastietojärjestelmästä. Niitä verrattiin Vitek2-laitteesta saatuihin tuloksiin. Määritysten kestoa Vitek2-laitteella verrattiin aikaisempiin tutkimuksiin. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 183 bakteerinäytettä, joista 76 oli ESBL-kantoja, 40 nonfermentatiivisia sauvabakteereja, 41 kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja sekä 26 uusia potilasnäytelöydöksiä.</p> <p>Vitek2 antoi 99 prosentille kaikista tutkituista ESBL-kannoista saman identifikaation kuin rutiinimenetelmät. Uusista potilasnäytelöydöksistä Vitek2 tunnisti 96 %. Nonfermentatiivisista sauvabakteereista ja kasvuolosuhteiltaan vaativista bakteereista Vitek2 tunnisti noin 70 % samalla tavalla kuin rutiinimenetelmät. Vitek2-laitteen antamat identifikaatioreaktiotulokset vastasivat paremmin Api20E-testin (94 %) kuin Api20NE-testin (70 %) reaktiotuloksia. Noin 80 % kaikista antibioottilherkkyystuloksista vastasi perinteisillä menetelmillä saatuja tuloksia. Vitek2-laitteella saadut antibioottilherkkyystulokset olivat yleensä rutiinimenetelmiä herkempiä. Vitek2-laitteella saadut ESBL-tulokset vastasivat rutiinimenetelmillä saatuja tuloksia noin 90-prosenttisesti. Verrattuna aikaisempiin tutkimuksiin Vitek2-laitteen suorittamat määritykset olivat rutiinimenetelmiä paljon nopeampia. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että Vitek2-laite on käyttökelpoinen bakteriologian laboratoriossa identifikaatio- ja antibioottilherkkyystutkimuksissa. Nonfermentatiivisia sauvabakteereja ja kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja voisi kuitenkin tutkia enemmän.</p>			
Avainsanat			
menetelmävertailu, Vitek2, bakteeri-identifikaatio, antibioottilherkkyysmääritys			

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care and Social Services
Author/Authors		
Järveläinen Marika, Roslund Ira and Silander Maarit		
Title		
Comparison of Identification and Antimicrobial Susceptibility Results with Routine Methods and Vitek2		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Autumn 2006	92 + 3 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>The bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing are usually performed manually. Recently, the number of samples has increased and the need for automatification has grown. BioMérieux has investigated Vitek2 for this purpose. HUSLAB has assigned us to compare the identification and antimicrobial results with respect to routine methods and Vitek2. Furthermore, we evaluate test reactions, ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) production and the time what it takes to get results with Vitek2.</p> <p>In this study, we examined a total of 183 bacterial isolates including 76 ESBL-strains, 40 nonfermenting rods, 41 fastidious bacteria and 26 fresh clinical isolates. The results of routine methods were gathered from the patient database and following this, compared to the results given by Vitek2.</p> <p>Vitek2 correctly identified more than 96 % of the ESBL-strains and fresh clinical isolates. The results of nonfermenting rods and fastidious bacteria were 70 % concordant with those of the routine methods. Test reaction results of Api20E were 94 % and Api20NE 70 % in concordance with Vitek2 results. Approximately 80 % of all Vitek2 antimicrobial results and 90 % of ESBL test results were correct. Compared to earlier studies, Vitek2 performed the tests faster than the routine methods.</p> <p>These results suggest that Vitek2 is capable of giving rapid and accurate results. However, nonfermenting rods and fastidious bacteria should be studied further.</p>		
Keywords		
method comparision, Vitek2, routine methods, identification, susceptibility		

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 LAAJAKIRJOISTEN BETALAKTAMAASIEN TUOTTAJAT	3
2.1 β -laktamaasiresistenssin mekanismi	3
2.2 Yleisimmät ESBL-entsyymejä tuottavat lajit	4
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ja <i>Klebsiella oxytoca</i>	6
2.2.3 <i>Proteus mirabilis</i>	6
2.3 ESBL-kantojen tunnistus	7
3 NONFERMENTATIIVISET GRAMNEGATIIVISET SAUVABAKTEERIT	9
3.1 Pseudomonakset	10
3.1.1 Fluoresoivat pseudomonakset	11
3.1.2 Ei-fluoresoivat pseudomonakset	12
3.2 <i>Achromobacter</i> -suku	13
3.3 <i>Akinetobakterit</i>	13
3.4 <i>Alcaligenes</i> -suku	14
3.5 <i>Asaia</i> -suku	15
3.6 <i>Bergeyella zoohelcum</i>	15
3.7 <i>Brevundimonas vesicularis</i>	15
3.8 Burkholderiat	16
3.9 <i>Chryseobacterium indologenes</i> ja <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	17
3.10 <i>Flavobacterium</i> -suku	17
3.11 <i>Myroides odoratus</i> ja <i>M. odoratimimus</i>	18
3.12 <i>Ochrobactrum anthropi</i>	18
3.13 <i>Ralstonia pickettii</i>	19
3.14 <i>Shewanella putrefaciens</i>	19
3.15 <i>Sphingobacterium</i> -suku	19
3.16 <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	20
4 KASVUOLOSUHTEILTAAN VAATIVAT BAKTEERIT	20
4.1 HACEK-ryhmä	20
4.1.1 Hemofilukset	21
4.1.2 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	22
4.1.3 <i>Cardiobacterium hominis</i>	23
4.1.4 <i>Eikenella corrodens</i>	23
4.1.5 Kingellat	24
4.2 <i>Capnocytophaga</i> -suku	25
4.3 <i>Gardnerella vaginalis</i>	25
4.4 <i>Kampylobakterit</i>	26
4.5 Moraksellat	27
4.6 Neisseriat	28
4.7 Oligellat	29
5 MUUT TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT BAKTEERILAJIT	30
5.1 <i>Aeromonakset</i>	31
5.2 <i>Citrobacter</i> -suku	31
5.3 Morganellat	32
5.4 <i>Yersinia</i> -suku	32

6 BAKTEERI-IDENTIFIKAATIOMENETELMÄT RUTIINIDIAGNOSTIIKASSA	33
6.1 Api® 20 E	33
6.2 Api® 20 NE	35
6.3 RapID™ ANA II System	37
6.4 RapID™ NH System	39
6.5 RapID™ NF Plus System	40
7 VITEK2-LAITE	42
7.1 Identifikaatiomääritys Vitek2-laitteella	43
7.1.1 Identifikaatiotestikortit	44
7.1.2 Testikorttien inokulaatio, sulkeminen ja inkubaatio	45
7.1.3 Identifikaation kolorimetrinen mittaus	46
7.2 Antibioottiherkkyysmääritys Vitek2-laitteella	47
7.2.1 Antibioottiherkkyyskortit	48
7.2.2 Antibioottiherkkyuden mittaus	49
7.2.3 Antibioottiherkkyysmäärityksen vaiheet	50
7.3 Identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmääritysten suoritus Vitek2-laitteella	53
8 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	54
9 TUTKIMUSONGELMAT	58
10 TUTKIMUKSEN SUORITUS	59
10.1 Tutkimuksessa käytettävien bakteerikantojen valinta	59
10.2 Työn suoritus	61
10.3 Tulosten käsittely	64
11 TUTKIMUSTULOKSET	67
11.1 Identifikaatiotulokset	67
11.3 Antibioottiherkkyystulokset	73
11.4 Identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmääritysten kesto Vitek2-laitteella	76
12 TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	76
13 POHDINTA	79
LIITTEET 1 - 3	

1 JOHDANTO

Nykyään bakteerien eristys sekä identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmääritykset tehdään skandinaavisissa kliinisen mikrobiologian laboratorioissa suurimmaksi osaksi manuaalisesti (Rantakokko-Jalava – Elo-Lehtonen – Meurman 2006: 43). Muilla kliinisen laboratoriotutkimuksen aloilla automaatio on edennyt jo selvästi pidemmälle. Tämä kehityssuunta saattaa johtua siitä, että bakteeridiagnostiikkaa on vaikeampi automatisoida tutkittavien bakteerien yksilöllisten ominaisuuksien ja kasvuvaatimusten vuoksi. Bakteriologinen diagnostiikka perustuu myös suurelta osin elävien organismien tuottamien reaktioiden ja antibioottien vaikutuksien havaitsemiseen bakteerikasvustossa, jolloin bakteeri täytyy saada eristettyä elävänä.

Mikrobiologisen tutkimusprosessin automatisoinnille on tullut tarvetta, koska näytemäärät ovat lisääntyneet ja tulokset halutaan saada mahdollisimman nopeasti (Rantakokko-Jalava ym. 2006: 43). Nykyiset mikrobiologiset tutkimusmenetelmät vaativat yleensä useita bakteerien yönylikasvatuksia. Diagnostiikan automatisoinnin ansiosta tuloksien saanti nopeutuisi ja työn laatu tulisi yhdenmukaisemmaksi, kun manuaalisesti suoritettavat työvaiheet vähenisivät. Bakteriologista tutkimusprosessia ei ole vielä saatu kokonaan automatisoitua, vaikka automatiikkaan perustuvat tutkimusmenetelmät ovatkin kehittyneet; bakteeri täytyy yhä ensiksi muun muassa kasvattaa manuaalisesti puhtasviljelmäksi.

Bakteerien antibioottiresistenssin lisääntyminen varsinkin pääkaupunkiseudulla lisää näytteiden ja työn määrää bakteriologian laboratoriossa. Antibiooteille resistenttien kantojen lääkeherkkyystulosten saaminen vie myös normaalia pidempään ja potilaiden hoito saattaa siksi viivästyä. Tutkimme opinnäytetyössämme laajakirjoisia betalaktamaaseja tuottavia ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) -kantoja. Nämä kannat ovat resistenttejä monille antibiooteille, muun muassa kolmannen polven kefalosporiineille. Niiden antibioottiherkkyystulosten tulkinta on haasteellista kantojen erilaisuuden takia. ESBL-tapausten määrä on kasvanut viime vuosina. Esimerkiksi vuonna 2001 Helsingin avoterveydenhuollon yksiköissä oli käynyt vain muutama potilas, joilta löytyi virtsasta *Escherichia coli* -lajin ESBL-kanta. Vuonna 2004 näitä potilaita oli Helsingin avoterveydenhuollossa jo noin 180. (Vaara 2005.)

Teemme opinnäytetyömme HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolle. Testaamme bakteriologian osastolla uutta bioMérieux:n Vitek2-laitetta, jolla tehdään bakteerien sekä hiivojen identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmäärittäyksiä. Vitek2-laitteen koekäytön avulla halutaan selvittää, olisiko laitteesta tulevaisuudessa hyötyä HUSLABille jollain bakteriologisen tutkimuksen osa-alueella (Hilla 2006). Vitek2-laitetta on aiemmin käytetty bakteerien tunnistamiseen ja antibioottiherkyyksien määrittämiseen myös muissa Suomen mikrobiologian laboratorioissa, kuten Turun yliopistollisessa keskussairaalassa (Rantakokko-Jalava ym. 2006). Ohjaajinamme työelämässä toimivat HUSLABin sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi ja laboratoriohoitaja Risto Hilla sekä bioMérieux Suomi Oy:n tuotespesialisti Juha Miller.

HUSLABin erityisenä mielenkiinnon kohteena on tutkia, kuinka hyvin Vitek2-laite tunnistaa rutiinimenetelmillä vaikeasti identifioitavia bakteereita ja mittaa ESBL-kantojen antibioottiherkkyksiä verrattuna perinteisiin laboratoriodiagnostiikassa käytettäviin rutiinimenetelmiin. ESBL-kantojen lisääntymisen takia on hyödyllistä tutkia, kuinka Vitek2-laite tunnistaa ESBL-ominaisuutta. Vitek2-laitteeseen on kehitetty uusi AST-N041-antibioottiherkkyystestikortti, joka tunnistaa erityisesti ESBL-kantoja. Sen toimivuutta halutaan tutkia verrattuna pohjoismaisessa käytössä olevaan gramnegatiivisten sauvabakteerien AST-N029-antibioottiherkkyyskorttiin. Laboratorion työntekijöitä kiinnostaa myös, kuinka nopeasti laite suorittaa määrittäykset. (Miller 2006.)

Sisällytämme tutkimukseemme bakteerikantoja, joita on vaikea identifioida rutiinimenetelmillä, koska ne reagoivat huonosti biokemiallisissa testeissä tai ovat kasvuolosuhteiltaan vaativia. Tällaisia kantoja ovat nonfermentatiiviset pseudomonaksen kaltaiset gramnegatiiviset sauvabakteerit sekä kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit (Attisha – Clark 1995). Vitek2-laitteen GN (Gram-Negative)-testikortti on kehitetty tunnistamaan pseudomonaksen kaltaisia nonfermentatiivisia sauvabakteereja entistä ID-GNB-korttia paremmin. Myös kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerien tunnistusta varten on kehitetty uusi NH (*Neisseria-Haemophilus*) -identifikaatiotestikortti. Arvioimme opinnäytetyössämme näiden identifikaatiotestikorttien toimivuutta. (Miller 2006.)

Käytämme tutkimuksessamme pakastimeen talletettuja bakteerikantoja, jotka on aikaisemmin diagnosoitu rutiinimenetelmillä. Tutkimme samat kannat Vitek2-laitteella. Keräämme potilastietojärjestelmästä aikaisemmat identifikaatio-, reaktio- ja antibioottiherkkyystulokset ja vertaamme niitä Vitek2-automaatin antamiin tuloksiin.

2 LAAJAKIRJOISTEN BETALAKTAMAASIEN TUOTTAJAT

Bakteereja, jotka tuottavat laajakirjoisia betalaktamaaseja kutsutaan ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase) -kannoiksi. ESBL-ominaisuutta etsitään rutiinidiagnostiikassa pääosin seuraavista gramnegatiivisista bakteereista: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ja *Proteus mirabilis*. Kyseiset bakteerit kuuluvat kaikki *Enterobacteriaceae*-heimoon. Muita ESBL-kantoja voivat olla esimerkiksi *Citrobacter*, *Shigella* ja *Pseudomonas aeruginosa*. Laajakirjoinen β -laktamaasi hajottaa kefalosporiineja ja saa siten aikaan resistenssin kolmannen polven kefalosporiineille. Klassisissa ESBL-kannoissa β -laktamaasin vaikutus estyy β -laktamaasi-inhibiittoreilla. ESBL-kannat ovat resistenttejä kaikille kefalosporiineille, astreonaamille, kapeakirjoisille β -laktaamiantibiooteille (penisilliini, ampisilliini, amoksilliini) ja piperasilliinille. (HUSLAB 2004; HUSLAB 2006; Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä –Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe) 2003; Meurman 2005: 71-79.)

2.1 β -laktamaasiresistenssin mekanismi

Eräitä bakteerilääkkeiden tärkeimmistä vaikuttavista aineista ovat β -laktaamit (penisilliini- ja kefalosporiiniryhmän yhdisteet). β -laktaamit estävät bakteerin soluseinän peptidoglykaanisynteesiä ja siten vaurioittavat bakteerin soluseinää. β -laktaameille resistentit bakteerit kykenevät tuottamaan antibioottien β -laktaamirenkaan hajottavia entsyymejä eli β -laktamaaseja. Gramnegatiivisilla bakteereilla β -laktamaasien tuotanto voidaan jakaa kromosomaalisten muutosten ja R-geenien aiheuttamaan β -laktamaasien tuottoon. R-geenit ovat plasmidivälitteisiä geenejä. Yksi R-plasmidi voi sisältää useamman R-geenin ja siten useita resistenssitekijöitä eri antibiootteja kohtaan. Niin sanottujen klassisten ESBL-kantojen β -laktamaasi on plasmidivälitteinen. Opinnäytetyössämme tutkittavia kefalosporiineja ovat I polven kefalosporiini kefalotiini, II polven kefalosporiinit kefuroksiimi ja kefoksitiini, III polven kefalosporiinit kefotaksiimi, keftatsidiimi ja kefpodoksiimi sekä IV polven kefalosporiini kefepiimi (Huovinen – Vaara – Liippo - Viljanen 2003: 117). (Forsius 2004.)

Penisilliinirungosta on kyetty kehittämään aineita, jotka sitoutuvat bakteerien tuottamiin β -laktamaaseihin ja inaktivoivat ne. Yksi tällainen aine on klavulaanihappo (β -

laktamaasi-inhibiittori). Sillä on heikko antibakteerinen vaikutus yksin käytettynä, mutta lääkeyhdistelmissä se laajentaa antibioottien vaikutusta bakteereihin huomattavasti. Niin sanotuilla klassisilla ESBL-kannoilla tarkoitetaan laajaspektrisiä β -laktamaaseja tuottavia bakteerikantoja, joiden β -laktamaasin vaikutus estyy β -laktamaasi-inhibiittoreilla. Ei-klassiset ESBL-kannat ovat resistenttejä kolmannen polven kefalosporiineille, mutta niiden resistenssi ei kumoudu β -laktamaasi-inhibiittoreilla. (Forsius 2004; HUSLAB 2006.)

ESBL-resistenssin aiheuttavia plasmidivälitteisiä entsyymejä tunnetaan jo yli 200. Tärkeimpiä geeniperheitä, jotka koodaavat plasmidivälitteisiä ESBL-entsyymejä ovat TEM, SHV ja CTX-M. TEM-ryhmään kuuluu myös β -laktamaasi-inhibiittoreille resistenttejä kantoja. TEM-geenivariantteja tiedetään olevan ainakin 144 erilaista. SHV-ryhmän β -laktamaaseja tunnetaan tällä hetkellä 70 erilaista ja niistä suurin osa on laajakirjoisia eli ne pystyvät hajottamaan kolmannen polven kefalosporiineja. Kaikki CTX-M-ryhmän β -laktamaasit ovat laajakirjoisia ja niitä on löydetty 49 erilaista. (Kansanterveyslaitos (KTL) 2006.)

TEM- ja SHV-luokan ESBL-kannoilla on todettu selvää resistenssiä keftatsidiimiä kohtaan ja vaihtelevaa resistenssiä kefotaksiimille. CTX-M-luokan ESBL:lla on vastaavasti todettu selvää resistenssiä kefotaksiimille ja vaihtelevaa resistenssiä keftatsidiimille. Kaikilla ESBL-kannoilla on selvää resistenssiä kefpodoksiimille. (Standards Unit 2005c: 8.)

2.2 Yleisimmät ESBL-entsyymejä tuottavat lajit

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ja *Proteus mirabilis* -lajit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon. Ne ovat gramnegatiivisia sauvoja, jotka elävät muun muassa ihmisten ja eläinten suolistossa, jätevesissä, maaperässä ja luonnonvesissä. *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvat bakteerit ovat oksidaasinegatiivisia ja ne pysyvät fermentoimaan glukoosia. (Attisha – Clark 1995; Siitonen – Vaara 2003: 176; Tissari – Anttila 2003a: 193.)

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli on gramnegatiivinen sauvabakteeri. *Escherichia coli* -kantoja on olemassa lukuisia ja niille kaikille on yhteistä samankaltainen aineenvaihdunta. Ne kuitenkin poikkeavat toisistaan muun muassa virulenssiltaan. *E. coli* on enterobakteeri eli suoliston alueen bakteeri. *E. coli* on suoliston normaaliflooran yleisin aerobinen bakteerikanta. *E. coli*-kannat serotyyppitetään niiden O, K ja H antigeenien mukaan. Koleilla on erilaisia fimbrioita ja adhesiineja, joiden avulla ne pysyvät tarttumaan ympäristöönsä. Useimmilla kannoilla on lisäksi flagelloja, joiden avulla ne pystyvät liikkumaan. (Siitonen – Vaara 2003: 176-177; Mahon – Manuselis 1995: 450; Attisha – Clark 1995.)

Normaalissa ympäristössään ihmisen ja eläinten suolistossa *E. coli* on ilmeisesti isännälleen hyödyllinen sillä se tuottaa K-vitamiinia ja estää muita, patogeenisempia bakteereja kolonisoimasta suolta. *E. coli* pystyy kuitenkin aiheuttamaan infektoita, mikäli se pääsee parenteraalitilaan eli suoliston ulkopuolelle limakalvojen vastustuskyvyn heikennyttyä tai vamman kautta. Toiset *E. coli* -kannat ovat toisia *E. coli* patogeenisempia. (Siitonen – Vaara 2003: 177.)

Laboratoriotesteissä *E. coli* -kannat ovat useimmiten ONPG-, lyysiini-, indoli-, glukoosi-, mannitoli-, sorbitoli-, arabinoosi ja asetaattiposiitiivisia. Ne ovat myös laktoosiposiitiivisia, tosin myös laktoosinegatiivisia koleja tavataan. *E. coli* -kannat ovat usein LDC ja ODC -positiivisia. Ne ovat useimmiten urea- ja rikkinegatiivisia. Amylaasi- ja sakkaaroosinegatiiviset *E. coli* -kannat ovat yleisiä. (Attisha – Clark 1995; bioMérieux 2004a; Mahon – Manuselis 1995: 451.)

Tavallisin *E. coli* aiheuttama infektio on virtsatieinfektio ja taudin aiheuttaja onkin yleensä peräisin omasta suoliston floorasta. Infektio voi levitä virtsaputkesta virtsarakkoon ja sieltä edelleen munuaisiin. Lisäksi *E. coli* aiheuttaa varsinkin suoliston alueella leikkaushoitoa vaativia tulehduksia kuten umpilisäkkeen tulehdusta. Syynä tällaisiin tulehduksiin on usein suoliston toimintahäiriö, jolloin normaaliflooran bakteerit pääsevät tunkeutumaan suolistosta kudokseen ja aiheuttavat sekainfektion. *E. coli* -infektion seurauksena voi kehittyä myös sepsis. *E. coli* -sepsis kehittyy usein ihmisille, joiden vastustuskyky on heikentynyt immunosuppression tai pahanlaatuisten kasvaimien vuoksi. Osalla *E. coli* -kannoista on lisäksi virulenssiominaisuuksia, joiden avulla ne pystyvät aiheuttamaan suolistoinfektioita. (Siitonen – Vaara 2003: 177 –178.)

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae* ja *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella-lajit ovat liikkumattomia gramnegatiivisia sauvoja, jotka pystyvät fermentoimaan eli käyttämään sokereita ravinnokseen. Klebsiellojen pesäkkeet elatusainemallalla ovat limaisia, mikä johtuu niiden kyvystä muodostaa polysakkaridikapseli. Tämän polysakkaridikapselin perusteella klebsiellat voidaan luokitella yli 70 K-antigeenityyppiin. Klebsiellat ovat lysiiniposiitivisia ja ne tuottavat kaasua. Klebsiellat ovat useimmiten myös ONPG-, sitraatti- ja ureaposiitivisia. Ne ovat ornitiini- ja rikinegatiivisia. *Klebsiella pneumoniae* on indolinegatiivinen, kun taas *K. oxytoca* on indoliposiitivinen. (Attisha – Clark 1995; Tissari – Anttila 2003a: 192; Mahon – Manuselis 1995: 456; bioMérieux 2004a.)

Tavallisin *Klebsiella pneumoniae* aiheuttama infektio on lohkokeuhkokuume, joka voi olla peräisin niin avohoidosta kuin sairaalahoidostakin. Rajusti alkavan keuhkokuumeen ennuste on huonompi kuin lievempioireisen. Keuhkokuumeelle altistavia tekijöitä ovat alkoholismi, diabetes ja krooninen ahtauttava keuhkotauti. Komplikaatioina *Klebsiella pneumoniae* -keuhkokuumeesta voivat seurata empyeema eli ontelomärkimä tai keuhkopussin kiinnikkeitä. *Klebsiella pneumoniae* ja *Klebsiella oxytoca* ovat melko tavallisia virtsatieinfektion aiheuttajia. Niitä tavataan myös kirurgisissa vatsan alueen näytteissä ja kirurgisissa haavainfektioissa. (Tissari – Anttila 2003a: 192; Mahon – Manuselis 1995: 457.)

Klebsiella-lajit tuottavat betalaktamaasia ja ovat siten luonnostaan resistenttejä ampisiliinille (Tissari – Anttila 2003a: 192). *Klebsiella oxytoca* bakteereilla on kromosomissaan β -laktamaasia koodaava geeni, jonka seurauksena osa *Klebsiella oxytoca* kannoista ylituottaa luokan K1 kromosomaalista β -laktamaasia. Tämän ylituotannon seurauksena ne pystyvät hydrolysoimaan penisilliinejä ja kefalosporiineja. Siitä johtuen ne ovat resistenttejä kefpodoksiimille ja usein myös kefotaksiimille, mutta herkkiä keftatsidiimille. Resistenssi estyy klavulaanilahapolla. Tämän vuoksi niitä on vaikea erottaa oikeista ESBL-kannoista. (Standards Unit 2005c: 11; Sirot ym. 1998: 2184.)

2.2.3 *Proteus mirabilis*

Proteukset ovat liikkuvia gramnegatiivisia sauvabakteereja. Ne muodostavat leviäviä pesäkkeitä, jotka huntuavat elatusainemallalla peittäen alleen koko muun kasvuston.

Proteus mirabilis on indolinegatiivinen ja ornitiiniposiitivinen. Proteukset tuottavat rikkivetyä ja niille on tyypillistä myös vahva ureaasireaktio. Ne ovat vahvasti glukoosiposiitiivisia. Proteukset ovat ONPG-, mannitoli-, sorbitoli-, arabinoosi- ja lyysiininegatiivisia. Useimmiten ne ovat myös amylaasinegatiivisia. Proteukset kolonisoivat usein suolta ja ovat taudinaiheuttamiskyvyltään opportunisteja. Ne aiheuttavat virtsatieinfektioita, jotka voivat kroonistua. (Tissari – Anttila 2003a: 194; Mahon – Manuselis 1995: 459; Attisha – Clark 1995; bioMérieux 2004a).

2.3 ESBL-kantojen tunnistus

Mikäli bakteeri on herkkyysmäärittelyn perusteella resistentti kefalosporiineille, tehdään sille lisäherkkyysmäärittelyksiä ja tarvittaessa ESBL-jatkotutkimuksia. ESBL-epäilyistä tehdään gramegatiivisten sauvojen lisäherkkyysmäärittelykset ja ESBL-kiekot. Uusista ESBL-tapauksista tehdään aina bakteerin nimen varmistus Api20E-testillä sekä taltioidaan kanta. (HUSLAB 2006.)

Märkä-, veri- ja ulosteiljelyistä lähdetään tutkimaan mahdollista ESBL-kantaa mikäli herkkyysmäärittelyksissä bakteerin kefotaksiimi- tai keftatsidiimiherkkyys (III polven kefalosporiinit) on alentunut, bakteeri on resistentti toisen polven kefalosporiinille, kefuroksiimille tai jos maljalla on havaittavissa niin sanottu pöllökuvio CTX (kefotaksiimi)-AMC (amoksisilliini-klavulaanihappo)-CAZ (keftatsidiimi) -kiekkojen välillä. Kuviossa 1 nähdään herkkyysmäärittämaljalla pöllökuvio, jolla tarkoitetaan kiekkojen välille syntyvää herkistymäaluetta. Tämä johtuu klavulaanihapon bakteerin betalaktamaasia inhiboivasta vaikutuksesta. Inhiboivan vaikutuksen ansiosta bakteerin kasvu estyy alueelta, jossa on sekä klavulaanihappoa että antibioottia. (HUSLAB 2006; Puohiniemi 2006.)

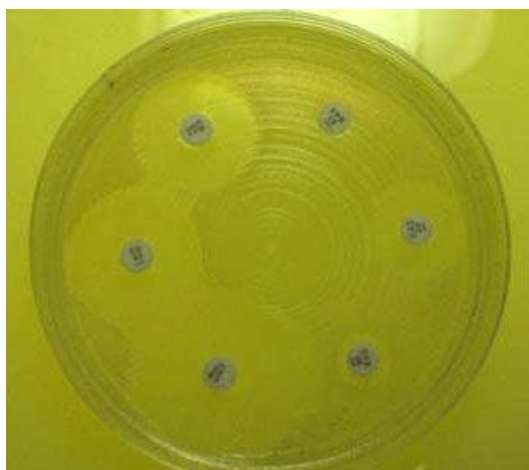


KUVIO 1. Pöllökuvio eli diagnostisten kiekkojen välille syntyvä herkistymäalue (Puohiniemi 2006).

Virtsaviljelyssä ESBL-kantaa lähdetään etsimään, jos bakteerin todetaan olevan resistentti tai herkkyydeltään alentunut kefalotiinille (I polven kefalosporiini). Tällöin näytteestä tehdään laajempi herkkyysmäärittäminen. Kyseessä voi olla ESBL-kanta mikäli bakteeri on lisäherkkyysmäärittämissä resistentti tai herkkyydeltään alentunut kefuroksiimille, kefotaksiimille tai keftatsidiimille tai jos herkkyysmaljalla on CTX-AMC-CAZ-kiekkojen välillä nähtävissä pöllökuvio. (HUSLAB 2006.)

ESBL-kiekkotestissä käytettäviä kielkoja ovat III polven kefalosporiinit kefpodoksiimi (CPD), keftatsidiimi (CAZ) ja kefotaksiimi (CTX) sekä samat antibiootit yhdistelmänä klavulaanihapon kanssa. Maljalta mitataan kielkojen estorenkaiden halkaisijat. Estorenkkaan halkaisijan tulee olla suurempi klavulaanihapon kanssa kuin ilman, jotta kanta olisi klassinen ESBL. (HUSLAB 2006.)

Kuviossa 2 antibiootti/klavulaanihappoyhdistelmäkiekot ovat maljan vasemmalla puolella. Pelkkää antibioottia sisältävät diagnostiset kiekot näkyvät kuviossa maljan oikealla puolella. Antibioottia ja klavulaanihappoa sisältävän diagnostisen kiekon estorenkkaan halkaisijaa millimetreinä verrataan maljan oikealla puolella olevan antibioottiekon estorenkkaan halkaisijaan. (HUSLAB 2006.)



KUVIO 2. ESBL-kiekkotestissä verrataan antibiootti/klavulaanihappoyhdistelmäkiekon ja pelkkää antibioottia sisältävän kiekon estorenkaiden halkaisijoiden eroa (Puohiniemi 2006).

Se, kuinka suuri estorenkaiden ero tulee olla, riippuu siitä minkä valmistajan ESBL-kiekoja käytetään. Käytettäessä Mast Diagnostic:n ESBL-kiekoja, lasketaan estorenkaiden halkaisijoiden ero siten, että antibiootti/klavulaanihappoyhdistelmäkiekon antama estorenkkaan halkaisija millimetreinä jaetaan antibioottiekon antaman estorenkkaan halkaisijan millimettilukemalla. Kaikkien kolmen antibiootin kohdalla noudatetaan samaa kaavaa. Kyseessä on ESBL-kanta, jos näin saatu arvo on $\geq 1,5$. Kyseessä ei ole

ESBL-kanta, jos mitattu arvo on $<1,5$. Oxoid:n ESBL-kiekkaja käytettäessä kunkin diagnostisen kiekon millimetrlukemasta klavulaanihapon kanssa vähennetään millimetrlukema ilman klavulaanihappoa. Kefpodoksiimin ja keftatsidiimin kohdalla eron tulee olla ≥ 5 millimetriä ja kefotaksiimin kohdalla ≥ 3 millimetriä, jotta kanta olisi ESBL. (Mast Diagnostics 2006; Oxoid 2006; HUSLAB 2006.)

Kanta luokitellaan ESBL-kannaksi, vaikka vain yhden antibiootin estorengas klavulaanihapon kanssa olisi riittävän paljon suurempi kuin ilman klavulaanihappoa. Silloin kun klavulaanihappo estää bakteerin kasvua puhutaan niin sanotusta klassisesta ESBL-kannasta, jolloin resistenssigeeni sijaitsee plasmidissa. Silloin kun klavulaanihappo ei estä bakteerin kasvua ja bakteeri on resistentti kolmannen polven kefalosporiineille puhutaan ei-klassisesta ESBL-kannasta. Tällöin resistenssi periytyy yleensä kromosomaalisena eikä leviä yhtä herkästi kuin plasmidissa. (HUSLAB 2006; Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä –Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe) 2005.)

3 NONFERMENTATIIVISET GRAMNEGATIIVISET SAUVABAKTEERIT

Nonfermentatiiviset gramnegatiiviset sauvat ovat bakteereja, jotka eivät käytä glukoosia tai muita hiilihydraatteja tehokkaasti tai lainkaan hyödykseen. Tällöin niitä on vaikea tunnistaa normaaleilla, sokereiden fermentaatioon perustuvilla biokemiallisilla menetelmillä. Nonfermentatiiviset bakteerit ovat monimuotoinen ryhmä, jota on vasta viime aikoina alettu luokittelemaan DNA:n samankaltaisuuden perusteella. Nonfermentatiivisia bakteereja ovat muun muassa pseudomonakset ja sen kaltaiset sauvat sekä akinetobakteerit. Nonfermentatiivisten ryhmään kuuluvia kantoja jaotellaan taksonomisesti koko ajan uudelleen. Ennen pseudomonaksiin luokitellut organismit on nykyään jaettu *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* ja *Stenotrophomonas* -sukuihin. Muita pseudomonaksen kaltaisia, nopeasti kasvavia gramnegatiivisia sauvabakteereja ovat esimerkiksi *Myroides*, *Sphingomonas*, *Sphingobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Shewanella*, *Chryseobacterium* ja *Weeksella* -sukuihin kuuluvat bakteerit. Monelle organismille ei ole lainkaan annettu lajitason nimeä. (Attisha – Clark 1995; HUSLAB 2005; Standards Unit 2005a: 5.)

Nonfermentatiiviset gramnegatiiviset sauvabakteerit aiheuttavat monenlaisia infektoita ihmisille. Yleisimpiä ovat sairaalaperäiset infektiot varsinkin potilailla, joilla immuunipuolustus on normaalia heikompi. Nonfermentatiivisia lajeja kasvaa monenlaisissa kasvuympäristöissä. Niiden aiheuttamat infektiot johtuvat usein kontaminoituneista hoitovälineistä. Nonfermentatiiviset bakteerit voivat kontaminoida myös klinisiä näytteitä ja vaikeuttaa siten oikeaa diagnoosia. (Standards Unit 2005a: 5.)

Kaupalliset bakteerien tunnistusmenetelmät eivät aina anna tarkkaa identifikaatiota nonfermentatiivisille sauvabakteereille. Nonfermentatiiviset gramnegatiiviset sauvabakteerit voidaan usein alustavasti erottaa positiivisten katalaasi- ja oksidaasireaktioiden (akinetobakteerilla oksidaasireaktio on negatiivinen) ja oksidatiivisen glukoosimetabolian perusteella. Niillä on usein myös tyypillinen gramvärjäytyvyys, tuoksu tai pigmentinmuodostuskyky. Nonfermentatiiviset gramnegatiiviset sauvabakteerit ovat yleensä aerobisesti eläviä, nopeakasvuisia ja pesäkkeiltään melko isoja. *Pseudomonas aeruginosa* ja *Stenotrophomonas maltophilia* voidaan tunnistaa lajitasolle asti yksinkertaisilla testeillä. Monet *Pseudomonas*-lajit ja *Alcaligenes*-suvun bakteerit muistuttavat bio-kemiallisesti hyvin paljon toisiaan. Niitä tunnistetaan Api20NE-testillä. Api20NE ei aina anna yksiselitteistä tulosta, jolloin tulokseksi voidaan vastata pelkästään pseudomonaksen kaltainen sauva. (HUSLAB 2005; Standards Unit 2005a: 5.)

3.1 Pseudomonakset

Pseudomonas-sukuun kuuluvat *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. sp.* CDC-ryhmä 1 sekä *P. oryzihabitans*. *Pseudomonas*-suvun jäsenet ovat nonfermentatiivisia, aerobisesti eläviä, itiöitä muodostamattomia, gramnegatiivisesti värjäytyviä sauvabakteereja. Ne ovat muodoltaan suorita tai vähän kaareutuvia. Pseudomonakset ovat liikkuvia; niillä on yksi tai useampi flagella eli värekarva. Ne kykenevät elämään vaikeissakin olosuhteissa käyttäen monenlaisia ravinteita hyödykseen, ja niitä esiintyy yleisesti maaperässä ja vesistössä. (Kiska – Gilligan 2003: 719; Tissari – Anttila 2005: 195, 199.)

Pseudomonakset aiheuttavat yleensä opportunistisia infektoita. Ne ovat resistenttejä monille antimikrobeille. Kliinisesti merkitykselliset pseudomonakset ovat oksidaasitestissä positiivisia lukuun ottamatta *P. luteolaa* ja *P. oryzihabitansia*. Suvun jäsenet ovat katalaasipositiivisia ja laktoosinegatiivisia. Suurin osa *Pseudomonas*-kannoista hajottaa

glukoosia oksidatiivisesti ja pelkistää nitraattia joko nitriitiksi tai typpikaasuksi. Niiden optimilämpötila on useimmiten 30-37°C. Suvun jäsenet on aikaisemmin jaettu viiteen ryhmään niiden ribosomaalisen RNA:n perusteella, mutta molekyylibiologisten tutkimusten perusteella sukua on ryhmitelty uudelleen ja uusia sukuja on muodostettu (Tissari – Anttila 2005: 195). *Pseudomonas*-suvun jäsenet voidaan jakaa fluoresoiviin ja ei-fluoresoiviin pseudomonaksiin. (Attisha – Clark 1995; Kiska – Gilligan 2003: 719, 723.)

3.1.1 Fluoresoivat pseudomonakset

Pseudomonas aeruginosa on yleisin kliinisistä laboratorionäytteistä eristetty nonfermentatiivinen bakteeri. *P. aeruginosa*lla on yksi flagella liikkumiseen. Se on aerobisesti elävä bakteeri, mutta kykenee kasvamaan myös anaerobisissa olosuhteissa mikäli nitraattia on käytettävissä. *P. aeruginosa* pystyy käyttämään useita orgaanisia yhdisteitä kasvaakseen. Glukoosia se käyttää oksidatiivisesti hyväkseen. *P. aeruginosa* viihtyy erityisesti kosteassa ympäristössä. Sen muodostamat pesäkkeet ovat beta-hemolyttisiä, leviäviä, litteitä, värillisiä ja metallinkiiltoisia. Laji tuottaa värillisiä pigmenttejä, joita ovat pyoverdiini (vihreä), pyosyaniini (sininen), pyorubiini (punainen) tai pyomelaniini (musta). Pigmentit fluoresoivat UV-valossa. *P. aeruginosa*lla on sille ominainen hedelmäinen, tuomenkukkamainen tuoksu. Se pystyy kasvamaan 42°C:ssa. Laji kykenee hydrolysoimaan asetamidia ja pelkistämään nitraatteja typpikaasuksi. Laji ei fermentoi laktoosia. *P. aeruginosa* on ainoana pseudomonaslajina resistentti diagnostiselle C390-kiekolle. (Tissari – Anttila 2005: 195-196; Kiska – Gilligan 2003: 723.)

P. aeruginosa aiheuttaa opportunistisia infektioita. Se ei yleensä pysty infektoimaan perusterveitä henkilöitä vaan infektion syntyyn tarvitaan jokin yleinen immuunipuolustusta heikentävä tai paikallinen ihon tai limakalvon suojaavaa vaikutusta estävä tekijä. *P. aeruginosa*lla tunnetaan useita virulenssitekijöitä, kuten tarttumis- ja kapselirakenteita ja kudostuhoa aiheuttavia tekijöitä. Niiden avulla bakteeri tarttuu ja tunkeutuu isäntäelimistön soluihin sekä suojautuu elimistön puolustusmekanismeilta ja antibiooteilta. *P. aeruginosa* aiheuttamia infektioita ovat muun muassa ulkokorvantulehdus, virtsatieinfektio, ihoinfektiot ja ruoansulatuskanavan infektiot. *P. aeruginosa* on betalaktamaasin tuottonsa, tehokkaan ulkomembraaninsa ja soluseinämässä sijaitsevien, antibiootteja solusta ulos kuljettavien pumppujensa ansiosta luonnostaan resistentti monille antimikrobeille. (Tissari – Anttila 2005: 196-199.)

Pseudomonas fluorescens ja *Pseudomonas putidalla* ei ole tyypillistä pesäkemorfolgiaa tai tuoksua. Molemmat lajit ovat fluoresoivia. Ne voidaan erottaa *P. aeruginosa*-ta, koska ne eivät kasva 42°C:ssa eivätkä tuota pyosyaniinia (Standards Unit 2005a: 6). Ne ovat myös kyvyttömiä pelkistämään nitraatteja typpikaasuksi, mutta kykenevät muodostamaan happoa ksyloosista. *P. fluorescens* erottuu *P. putidasta* siten, että se kykenee kasvamaan 4°C:ssa ja hydrolysoimaan gelatiinia. *P. fluorescens* ja *P. putida* ovat vain heikosti virulenttisia ja siksi niillä ei yleensä ole kliinistä merkitystä. *P. fluorescens* saattaa kuitenkin kontaminoida verituotteita ja aiheuttaa bakteremian verensiirtopotilaille. (Kiska – Gilligan 2003: 723.)

Pseudomonas monteilii voidaan erottaa muista fluoresoivista pseudomonaksista sen puuttuvan nitraatinpelkistyskyvyn avulla. Se ei myöskään pysty tuottamaan happoa ksyloosista. *Pseudomonas veronii* pystyy tuottamaan typpikaasua nitraatista, muttei osaa hydrolysoida asetamidia eikä pysty kasvamaan 42°C:ssa. Muut fluoresoivat pseudomonakset ovat yleensä kliinisissä näytteissä harvinaisia. Monelta näistä kannoista puuttuu kyky hydrolysoida arginiinia. Yleensä niiden tunnistus sukutasolle riittää, jos mainitsee, ettei kyseessä ole tautia-aiheuttava *P. aeruginosa*. (Kiska – Gilligan 2003: 723.)

3.1.2 Ei-fluoresoivat pseudomonakset

Pseudomonas stutzeri ja *Pseudomonas mendocina* eivät fluoresoi UV-valossa. *P. stutzeri* muodostaa kuivia, ryppyisiä, *Burkholderia pseudomallei* muistuttavia pesäkkeitä. *P. stutzerin* pesäkkeet saattavat kaivautua tai liimaantua kasvatusagariin. Pesäkkeiden väri vaihtelee ruskeankeltaisesta ruskeaan. *P. stutzeri* ja *B. pseudomallei* voidaan erottaa toisistaan siten, että *P. stutzerilta* puuttuu kyky muuntaa arginiinia ja muodostaa happoa laktoosista. Tärkkelyksen hydrolysointikyky erottaa *P. stutzerin* muista pseudomonaksista. (Kiska – Gilligan 2003: 723.)

P. mendocinan pesäkkeet ovat sileitä ja litteitä. Laji tuottaa kellertävänruskeaa pigmenttiä. Tyypillistä lajille on sen kyky muuntaa nitraatteja typpikaasuksi ja hydrolysoida arginiinia. Se on kyvytön hydrolysoimaan asetamidia tai tärkkelystä. (Kiska – Gilligan 2003: 723.)

Pseudomonas alcaligenes ja *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ovat harvinaisia, fluoresoimattomia bakteereja. Niillä ei ole spesifistä pesäkemorfologiaa tai pigmenttiä. Muihin pseudomonaksiin verrattuna ne ovat biokemiallisesti tehottomia. Ne voidaan erottaa muista reagoimattomista gramnegatiivisista sauvoista niiden positiivisen oksidaasireaktion, liikkuvuuden ja kyvyn kasvaa MacConcey-maljalla avulla. *P. alcaligenes* poikkeaa *P. pseudoalcaligenesista* siten, että se ei kykene hapettamaan sokereita eikä kasvamaan 42°C:ssa. *P. pseudoalcaligenes* pystyy käyttämään fruktoosia heikosti hyväkseen. (Kiska – Gilligan 2003: 723.)

Pseudomonas luteola ja *Pseudomonas oryzihabitans* voidaan erottaa muista pseudomonaksista niiden negatiivisen oksidaasireaktion sekä niiden solunsisäisen liukenemattoman keltaisen pigmentin avulla. Ne eivät fluoresoi. Molemmat lajit muodostavat karkeita, ryppyisiä ja takertuvia, harvoin sileitä pesäkkeitä. *P. luteola* kykenee hydrolysoimaan o-nitrofenyyli- β -D-galaktopyranosiidia (ONPG) sekä eskuliinia ja poikkeaa siten *P. oryzihabitansista*. (Kiska – Gilligan 2003: 723-724.)

3.2 *Achromobacter*-suku

Achromobacter-suvun bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja, jotka elävät pääsääntöisesti maaperässä ja vesistöissä. Ne kykenevät liikkumaan flagellojensa avulla. *Achromobacter*-sukuun kuuluvat bakteerit ovat oksidaasiposiivisia ja indolinegatiivisia. Niillä on kyky kolonisoida vastustuskyvyltään heikentyneiden suolistoa ja hengitysteitä. *A. xylosoxidans* on tavallisin ihmisistä eristetty *Achromobacter*-suvun bakteeri. Se kykenee aiheuttamaan sairaalainfektioepidemioita muun muassa kontaminoituneiden liuosten ja laitteiden välityksellä. (Schreckenberger – Daneshvar – Weyant – Hollis 2003: 755; Tissari – Anttila 2003b: 201.)

3.3 Akinetobakteerit

Akinetobakteereja on ainakin 19 erilaista, joista seitsemän on nimetty lajitasolle asti. Ne ovat *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii* ja *A. radioresistens*. Akinetobakteerit ovat luonnossa yleisesti esiintyviä, ehdottoman aerobisia bakteereja. Ne kuuluvat ihmisen ihon ja suoliston normaaliflooraan eivätkä yleensä aiheuta infektioita. Immuunipuolustuksen heikentyminen lisää akineto-

bakteerin aiheuttaman kolonisaation tai infektion riskiä. Bakteri-infektio voi olla virtsateissa, hengitysteissa, pehmytkudoksessa, veressä tai keskushermostossa. (Standards Unit 2005a: 7; Tissari – Anttila 2005: 202.)

Akinetobakteerit ovat nonfermentatiivisia, liikkumattomia, nopeakasvuisia ja kasvuvä-
timuksiltaan melko vaatimattomia. Laboratoriotesteissä ne ovat oksidaasi- ja nitraat-
tinegatiivisia sekä katalaasiposiitivisia. Gramvärjäyksessä ne ovat lyhyitä, gramnegatiiv-
isia sauvabakteereja. Ne saattavat muistuttaa vähän diplokokkeja ja bakteeri voi myös
värjäytyä osittain tai heikosti grampositiiviseksi. Bakteripesäkkeet ovat yleensä sileitä,
limaisia, vaaleankeltaisia tai harmaanvalkoisia. Pesäkkeet ovat samankokoisia kuin en-
terobakteereilla. Osa muodostaa ruskehtavaa, diffundoituvaa pigmenttiä. Varsinkin *A.*
haemolyticus hemolysoi lampaanverimaljalla. (Tissari – Anttila 2005b: 202; Standards
Unit 2005a: 7.)

Akinetobakteereilla on hyvä kuivuuden sekä erilaisten happamuusolosuhteiden ja läm-
pötilojen sietokyky. Optimilämpötila useimmilla akinetobakteereilla on 30-35°C (Stan-
dards Unit 2005a: 7). Sairaaloissa esiintyvien akinetobakteerilajien antibioottiresistenssi
on lähivuosina lisääntynyt, ja laji voi aiheuttaa sairaalainfektioepidemioita. Tavallisin
kliinisistä näytteistä, varsinkin tehohoidon yksiköistä eristetty akinetobakteerilaji on *A.*
baumannii, joka voi olla hyvinkin resistentti antibiooteille (Standards Unit 2005a: 7).
Api20NE-testissä se käyttää omenahappoa sataprosenttisesti hyväkseen ja on muun mu-
assa sitraatti-, fenyylietikkahappo- ja kapriinihappoposiitivinen. Yleensä myös glukoo-
sin assimilaatiotesti ja arabinoosi ovat positiivisia. (Tissari – Anttila 2005: 202;
bioMérieux 2004b.)

3.4 *Alcaligenes*-suku

Alcaligenes-suvun lajit ovat oksidaasi- ja katalaasiposiitivisia, gramnegatiivisia sauva-
bakteereja. Ne ovat ehdottoman aerobeja ja kasvavat usein hyvin tavallisilla bakteerivil-
jelymaljoilla. Verimaljalla *Alcaligenes*-lajit muodostavat matalia, leviäviä pesäkkeitä. *A.*
fecalis saattaa aiheuttaa lievää alfahemolyysiä lampaanverimaljalla. Sen muodostamat
pesäkkeet tuoksuvat makealta. Kaikki lajit muuttavat nitraattia nitriitiksi. (Hall 1995:
528-529; Baron – Peterson – Finegold 1994: 400.)

Alcaligenes-suvun bakteereja voidaan löytää muun muassa vedestä. Ne infektoivat yleensä vain immuniteettikyvyltään heikentyneitä ihmisiä, ja niitä voidaan löytää esimerkiksi sairaalapotilailta virtsasta, ulosteesta, ysköksistä ja haavoista. *Alcaligenes xylosoxidans* -lajia on löydetty muun muassa potilailta, joilla on korvatulehdus, aivokalvontulehdus, leikkaushaavan tulehdus, keuhkokuume, virtsatietulehdus tai bakteremia. (Hall 1995: 529; Baron ym. 1994: 399.)

3.5 *Asaia*-suku

Asaia-sukuun kuuluu kaksi lajia *A. bogorensis* ja *A. siamensis*. Tämän suvun bakteerit pystyvät muuttamaan etanolin etikkahapoksi. Suvun bakteereita tavataan trooppisissa maissa, joissa niitä esiintyy muun muassa orkideoissa ja riisissä. *Asaia*-suvun bakteerit eivät pysty lisääntymään 37°C:ssa. (Moore – McCalmont – Xu – Millar – Neville 2002: 4130-4131; Fredricks – Ramakrishnan 2006: 250.)

3.6 *Bergeyella zoohelcum*

Bergeyella zoohelcum oli aiemmalta nimeltään *Weeksella zoohelcum*. *Bergeyella zoohelcum* kuuluu eläinten, muun muassa koirien, suun normaaliflooraan. Siitä johtuen kliiniset infektiot liittyvät yleensä eläimen puremaan. *Bergeyella zoohelcum* on eskuliini-, glukoosi-, arabinoosi-, mannitoli- ja maltoosinegatiivinen. Se on urea-, oksidaasi- ja indolipositiivinen. (Schreckenberger ym. 2003: 772; Tissari – Anttila 2003b: 202; bioMérieux 2004b; Hall 1995: 531.)

3.7 *Brevundimonas vesicularis*

Brevundimonas (ennen *Pseudomonas*) *vesicularis* on gramnegatiivinen, itiöitä muodostamaton, suora tai vähän kaareutuva sauvabakteeri. Bakteerilla on yksi polaarinen flagella. Laji on nonfermentatiivinen ja katalaasipositiivinen, mutta vain heikosti oksidaasipositiivinen. Bakteeri kykenee hapettamaan glukoosia, mutta suurin osa kannoista ei pelkistä nitraattia nitriitiksi. *B. vesicularis* muodostaa pigmenttiä, jonka ansiosta bakteeripesäkkeet näyttävät keltaisilta tai oransseilta. Se kasvaa hitaasti normaaleilla kasvu- alustoilla, koska se tarvitsee tiettyjä vitamiineja. *B. vesicularis* kykenee yleensä hydrolysoimaan eskuliinia, minkä perusteella laji voidaan erottaa *B. diminutasta*. *B. vesicularis*

ris löytyy vain harvoin kliinisistä näytteistä. Lajin aiheuttamia bakteremioita on havaittu muun muassa immuunipuutteisilla potilailla, sydämen avoleikkauspotilailla sekä sirp-pisoluaneemikoilla. (Gilligan – Lum – Vandamme – Whittier 2003: 731,733, 739; Standards Unit 2005a: 8.)

3.8 Burkholderiat

Kliinisesti tärkeitä *Burkholderia*-sukuun kuuluvia lajeja ovat *B. cepacia*, *B. pseudomallei* ja *B. mallei*, joista kahta ensimmäistä käytämme opinnäytetyössämme. Ne aiheuttavat infektioita ihmisillä ja eläimillä. *Burkholderia cepacia* on yleisesti luonnossa esiintyvä, kasvuvaatimuksiltaan vaatimaton, nonfermentatiivinen, gramnegatiivinen sauvabakteeri. *B. cepacia*n primaariviljelyalustana kannattaa käyttää sille selektiivistä maljaa. *B. cepacia* on ONPG- ja katalaasipositiivinen, nitraattinegatiivinen bakteeri, joka ei fermentoi laktoosia. Se on oksidaasipositiivinen, mutta reaktion vahvuus vaihtelee. Jotkut kannat tuottavat ei-fluoresoivia pigmenttejä. Bakteeri aiheuttaa opportunistisia infektioita, varsinkin potilaille, joilla on kystinen fibroosi tai jokin muu edeltävä keuhkotauti. Yleisin sen aiheuttama infektio on keuhkokuume. Laji on luonnostaan resistentti monille antibiooteille. *B. cepacia* luokiteltiin ennen *Pseudomonas*-sukuun kuuluvaksi. Se on kuitenkin selvästi resistentimpi antibiooteille kuin esimerkiksi *P. aeruginosa*. *B. cepacia*n voi erottaa pseudomonaslajeista positiivisen lysiinireaktion perusteella. (Standards Unit 2005a: 6; Attisha – Clark 1995; Tissari – Anttila 2005: 200-201; Health Protection Agency 2006.)

Burkholderia pseudomallei on Kaakkois-Aasiassa, Pohjois-Australiassa ja Etelä-Amerikassa esiintyvä, aerobisesti elävä, liikkuva ja gramvärjäyksessä usein bipolaarisesti värjäytyvä gramnegatiivinen sauvabakteeri (Puohiniemi 2006). Värjäyksessä bakteerisolut saattavat näkyä pitkinä, tiiviinä nippuina, vaikka ne ovat todellisuudessa asettuneet ketjuiksi. *B. pseudomallei*n pesäkkeet ovat joko limaisia ja sileitä tai ryppyisiä, kuivia ja *Pseudomonas stutzeri* muistuttavia. *B. pseudomallei* kasvaa hyvin 42°C:ssa. Pitkittyneen inkubaation aikana bakteeri voi muodostaa keltaoranssia pigmenttiä. Tunnistustesteissä *B. pseudomallei* hapettaa glukoosia ja hajoittaa arginiinia. Se on oksidaasi- ja nitraattipositiivinen, mutta ONPG-negatiivinen. Usein *B. pseudomallei* voidaan luotettavasti tunnistaa Api20NE:llä, mutta sitä voi olla vaikea erottaa ei-pigmentoivista *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* ja *B. mallei* -kannoista. (Standards Unit 2005a: 7; Health Protection Agency 2006.)

B. pseudomallei aiheuttaa melioidoosia endeemisesti Kaakkois-Aasiassa. Melioidoosin taudinkuva vaihtelee suuresti. Taudinkuva voi olla oireeton tai keuhkoinfektio, paikallinen, märkivä infektio tai septinen infektio. *B. pseudomallei* aiheuttama keuhkokuume muistuttaa joskus tuberkuloosia. Tartunta tapahtuu joko ihon kontaminoiduttua maaperällä tai syömisen, nenän tai hengitysteiden kautta. Aika tartunnasta oireiden alkamiseen voi vaihdella muutamasta päivästä jopa 20-30 vuoteen. (Tissari – Anttila 2005: 200.)

3.9 *Chryseobacterium indologenes* ja *Chryseobacterium meningosepticum*

Chryseobacterium-lajit ovat ympäristöbakteereja, joita löytyy vesistä, maaperästä ja elintarvikkeista. Ne ovat nonfermentatiivisia, katalaasi- ja oksidaasipositiivisia, heikosti indolipositiivisia sekä liikkumattomia. Gramvärjäyksessä ne ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja, joiden keskiosa on usein päitä kapeampi. *Chryseobacterium meningosepticum*in pesäkkeet ovat sileitä ja kohtuullisen isoja, halkaisijaltaan noin 1-2 mm. Ne saattavat heikosti muodostaa keltaista pigmenttiä. *Chryseobacterium indologenes*in pesäkkeet ovat syväkeltaisia bakteerin muodostaman pigmentin, fleksirubiinin ansiosta. (Tissari – Anttila 2005: 201-202; Schreckenberger ym. 2003; 769.)

Chryseobacterium-lajit ovat taudinaiheuttamiskyvyltään heikkoja ja yleensä bakteerin löytyminen kliinisestä näytteestä on merkki bakteerilla kolonisoitumisesta eikä niinkään infektiosta. *C. meningosepticum* aiheuttaa *C. indologenes*istä useammin infektoita, kuten vastasyntyneiden meningiittiä. Aikuisille se voi aiheuttaa hengitystieinfektion, mikäli henkilö on puolustuskyvyltään heikentynyt. *Chryseobacterium*-lajit ovat resistenttejä useimmille betalaktaameille, karbapeneemeille ja aminoglykosideille. (Tissari – Anttila 2005: 201-202.)

3.10 *Flavobacterium*-suku

Flavobacterium-sukuun kuuluvat bakteerit ovat liikkumattomia. Ne näkyvät gramvärjäyksessä gramnegatiivisina ohuina ja pitkinä sauvabakteereina. Niitä esiintyy yleisesti vesistöissä ja maaperässä. Monet *Flavobacterium*-lajit ovat kalojen patogeeneja eivätkä ne kuulu ihmisen normaaliflooraan. Kliinisesti tärkeimmät kyseiseen sukuun kuuluneista bakteereista ovat *F. indologenes*, *F. meningosepticum*. Ne on kummatkin muutettu *Chryseobacterium*-sukuun kuuluviksi ja ovat siten nykyisin nimeltään *Chryseobacteri-*

um indologenes ja *C. meningosepticum*. Useimmat *Flavobacterium*-sukuun kuuluvat bakteerit ovat DNAasi- ja oksidaasipositiivisia. Kaikki *Flavobacterium*-sukuun kuuluvat bakteerit ovat indolinegatiivisia. Niille on tyypillistä tuottaa keltaista pigmenttiä. (Schreckenberger ym. 2003: 769; Hall 1995: 530-531; Sharee – McCammon – Bowman 2000: 1055; Bellais – Naas – Nordmann 2001: 966.)

3.11 *Myroides odoratus* ja *M. odoratimimus*

Aiemman *Flavobacterium odoratum* -lajin on todettu sisältäneen kaksi erilaista bakteerilajia, jotka on nykyisin jaoteltu *Myroides*-sukuun kuuluviksi. Nämä bakteerit ovat nimeltään *Myroides odoratus* ja *M. odoratimimus*. Ne ovat kummatkin nonfermentatiivisia gramnegatiivisia sauvoja, joiden tiedetään aiheuttavan opportunistisia infektioita ja olevan resistenttejä monille bakteerilääkkeille. *M. odoratus* ja *M. odoratimimus* -lajien bakteeripesäkkeet ovat usein leviäviä ja hedelmän tuoksuisia. Kummatkin kyseisistä bakteereista ovat indolinegatiivisia. *Myroides*-sukuun kuuluvat bakteerit ovat glukoosi-, arabinoosi-, mannitoli-, maltoosi- ja indolinegatiivisia. Ne ovat yleensä myös eskuliininegatiivisia. *Myroides*-suvun bakteerit ovat useimmiten ureapositiivisia ja aina oksidaasi- ja katalaasipositiivisia. Rutiinimenetelmillä ei pystytä erottamaan *Myroides odoratus* ja *M. odoratimimus* -lajeja toisistaan. (Schreckenberger ym. 2003: 755; Motwani – Krezolek – Symeonides – Khayr 2004: 343-344; bioMérieux 2004b; Hall 1995: 531.)

3.12 *Ochrobactrum anthropi*

Ochrobactrum anthropi on gramnegatiivinen liikkuva sauvabakteeri. *Ochrobactrum anthropi* on ympäristöbakteeri, ja sitä tavataan yleisesti vesistöissä. *Ochrobactrum anthropi* on glukoosinegatiivinen ja usein myös mannitolinegatiivinen. Se on usein urea-, rikki-, arabinoosi-, maltoosi-, katalaasi- ja oksidaasipositiivinen. *O. anthropi* aiheuttaa pääsääntöisesti vierasesineinfektioita. Se on resistentti kefalosporiineille. (Tissari – Anttila 2003b: 202; Schreckenberger ym. 2003: 758-760; Hall 1995: 530; bioMérieux 2004b.)

3.13 *Ralstonia pickettii*

Ralstonia pickettii on aiemmalta nimeltään *Pseudomonas pickettii*. Se on gramnegatiivinen, liikkumaan kykenevä nonfermentoiva sauvabakteeri. Sen elinympäristöjä ovat vesistöt, maaperä ja kasvit. Lisäksi se voi kolonisoida terveen ihmisen ylähengitysteitä. *R. pickettii* on oksidaasiposiitivinen ja pystyy lisääntymään 41 °C:n lämpötilassa. *Ralstonia pickettii* on eskuliini- ja maltoosinegatiivinen ja usein myös glukoosi-, urea- ja mannitolinegatiivinen. Se on yleensä oksidaasiposiitivinen. *Ralstonia pickettii* voi aiheuttaa immuunivasteeltaan heikentyneelle ihmiselle hengitysteiden infektioita. Osa *Ralstonia pickettii* -kannoista voi olla hyvinkin resistenttejä mikrobilääkkeille. (Schreckenberger ym. 2003: 736-739; Stelzmueller ym. 2006: 99; Standards Unit 2005a: 9; bio-Mérieux 2004b.)

3.14 *Shewanella putrefaciens*

Shewanella putrefaciens (aikaisemmin *Pseudomonas putrefaciens*) on nonfermentatiivinen, liikkuva, oksidaasiposiitivinen ja gramnegatiivinen sauvabakteeri. Sen muodostamat bakteeripesäkkeet ovat kuperia, pyöreitä, sileitä ja silloin tällöin limaisia. Verimaljalla se tuottaa ruskeanoranssia pigmenttiä. Lajille on tyypillistä tuottaa rikkivetyä (H₂S). Laji tuottaa ornitiinidekarboksylaasia ja DNAasia sekä pelkistää nitraatin. (Standards Unit 2005a: 9; Paqniez – Berche 2005; Schreckenberger ym. 2003: 766-767.)

S. putrefaciens on laajalle levinnyt ympäristössä, varsinkin vesistöissä sekä liha- ja siipikarjassa. Se aiheuttaa harvoin infektioita ihmisille. Osalla ihmisistä *S. putrefaciens* voidaan eristää normaalifloorasta eikä lajilla yleensä ole kliinistä merkitystä. Se voi kuitenkin aiheuttaa opportunistisia infektioita, joita ovat esimerkiksi ihoinfektiot, pehmytkudosinfektiot ja bakteremia. *S. putrefaciens* voidaan helposti sekoittaa normaaleilla tunnistustesteillä *Shewanella algaen* kanssa, joten laji täytyy tunnistaa tarkemmilla molekyylibiologisilla menetelmillä. (Standards Unit 2005a: 9; Paqniez – Berche 2005.)

3.15 *Sphingobacterium*-suku

Sphingobacterium-sukuun kuuluvat lajit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja. Niillä ei ole flagellaa, mutta osa kannoista pystyy liikkumaan liukumalla. Kasvatusalustalla kas-

vavista pesäkkeistä voidaan huomata, että ne tuottavat keltaista pigmenttiä. Ne ovat oksidaasi-, katalaasi- ja eskuliiniposiitiivisia ja indolinegatiivisia. Yleisimmät kliinisistä näytteistä eristetyt kannat ovat *Sphingobacterium multivorum* ja *S. spiritivorum*. (Schreckenberger ym. 2003: 764; Standards Unit 2005a: 9; Hall 1995: 531.)

3.16 *Sphingomonas paucimobilis*

Sphingomonas paucimobilis on aiemmalta nimeltään *Pseudomonas paucimobilis* (Balkwill – Fredrickson – Romine 2003). Se on nonfermentatiivinen gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka tuottaa keltaista pigmenttiä. Se vaatii laboratorio-olosuhteissa 48 tunnin kasvatuksen verimaljalla. *S. paucimobilis* kykenee liikkumaan flagellansa avulla. Sen elinympäristöjä ovat ilmeisesti vesistöt, mutta sitä on eristetty myös sairaaloiden laboratoriovälineistä. *Sphingomonas paucimobilis* aiheuttaa ihmisillä opportunistisia infektoita. *S. paucimobilis* on katalaasiposiitiivinen. (Schreckenberger ym. 2003: 761-763; Smalley 1982: 564-565; Hall 1995: 525.)

4 KASVUOLOSUHTEILTAAN VAATIVAT BAKTEERIT

Kasvuolosuhteiltaan vaativiin bakteereihin kuuluvat muun muassa niin sanotun HACEK-ryhmän bakteerit, *Capnocytophaga*-lajit, *Gardnerella vaginalis*, kampylobakteerit, moraksellat, neisseriat, oligellat ja pasteurellat. Nämä bakteerit tarvitsevat rikkaan kasvualustan ja joillain lajeilla on lisäksi omia erityisiä kasvuvaatimuksia (HUSLAB 2005).

4.1 HACEK-ryhmä

HACEK-ryhmän nimitys tulee sanoista *Haemophilus-Actinobacillus-Cardiobacterium-Eikenella-Kingella*. Tarkemmin ryhmään kuuluvat *Haemophilus*-lajit, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* ja *Kingella*-lajit. HACEK-ryhmän bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja. Useimmat niistä vaativat kasvuympäristössään normaalia suuremman hiilidioksidipitoisuuden. Ne kuuluvat suun normaaliflooraan, jossa ne myös voivat aiheuttaa paikallisia infektoita. Lisäksi HACEK-bakteerit voivat verenkiertoon päästessään aiheuttaa muita infektoita, erityisesti

endokardiittia. Näille bakteereille on ominaista kiinnittyä sydänläppiin, varsinkin vaurioituneisiin läppiin tai proteesiläppiin. HACEK-ryhmän bakteerit ovat taudinaiheuttamiskyvyltään opportunisteja ja aiheuttavat infektion vain immunitaettikyvyltään heikentyneelle henkilölle tai kudokseen, jonka immuunivaste on huonontunut. Vain noin 3 % infektiivisistä endokardiiteista on HACEK-bakteerien aiheuttamia. Useimmiten näissä tapauksissa kyseessä ovat *Haemophilus*-lajit, *A. actinomycetemcomitans* ja *C. hominis*. Bakteerin identifiointi voi viedä paljon aikaa, koska HACEK-bakteerit ovat hidaskasvuisia. Veriviljelyn muuttuminen positiiviseksi voi viedä jopa 30 vuorokautta sellaisten potilaiden kohdalla, joilla on HACEK-bakteerin aiheuttama endokardiitti. Tämän takia pitää laboratoriolle ilmoittaa mahdollisesta HACEK-epäilystä. HACEK-bakteerien aiheuttama proteesiläpän endokardiitti ei yleensä vaadi kirurgista hoitoa, toisin kuin muiden gramnegatiivisten bakteerien aiheuttamat endokardiitit. Hoidoksi suositellaan ensisijaisesti kolmannen polven kefalosporiinia. (Vuento – Kujala 2003: 204-206; Kasper – Barlam 2005: 867; Hall 1995: 534-535.)

4.1.1 Hemofilukset

Haemophilus-lajeja on viisitoista. Hemofilukset ovat gramnegatiivisia, soikeita tai sauvan muotoisia bakteereita. Ne kasvavat parhaiten 37°C:ssa ja hiilidioksidiatmosfäärissä. Hemofilukset tarvitsevat rikkaan kasvualustan, jossa on joko X- ja/tai V-tekijää. Kasvuvaatimukset voidaan testata faktoritestillä (HUSLAB 2005). X-tekijä tarkoittaa hemiiniä ja V-tekijä NAD (nicotine adenine dinucleotide) –molekyyliä. Ne hemofilukset, joiden nimessä on ”para”, tarvitsevat vain V-tekijän. Lampaanverimalja sisältää vain X-tekijää. Primaariviljelyvaiheessa kuitenkin myös V-tekijää tarvitsevat hemofilukset saattavat kasvaa lampaanverimaljalla. Tällöin NAD:ta vapauttavat bakteerit kuten *Staphylococcus* mahdollistavat hemofilusten kasvun läheisyydessään. Tätä satellitismiksi kutsuttua ilmiötä voidaan käyttää avuksi tunnistuksessa. (Standards Unit 2005b: 5, 7; Manuselis – Barnishan – Scheicher 1995: 419.)

Useimmat laboratoriot käyttävät hemofilusten viljelyssä suklaamaljaa. Suklaamaljan valmistuksessa punasolut hajotetaan kuumentamalla, jolloin sekä X- että V-tekijä ovat bakteerien käytettävissä. *H. ducreyi* tarvitsee selektiivisen maljan ja sen optimi kasvatustemperatuurina on 33-34°C. Hemofilukset muodostavat pieniä ja kuperia pesäkkeitä. *H. haemolyticus* ja *H. parahaemolyticus* aiheuttavat hemolyysiä hevosen verta sisältävällä maljalla (HUSLAB 2005). Identifikaatiossa otetaan huomioon bakteerin kasvuvaati-

mukset, morfologia ja biokemiallisten testien tulokset. Hemofilukset ovat useimmiten oksidaasi- ja katalaasipositiivisia. (Standards Unit 2005b: 5, 7; Manuselis ym.1995: 419, 423-428.)

Haemophilus-bakteerit muodostavat noin 10 % ihmisen ylähengitysteiden normaalifloorasta. Vallitseva *Haemophilus*-laji suun ja nielun alueella on *H. parainfluenzae*. Yli puolet HACEK-endokardiiteista on *Haemophilus*-lajien aiheuttamia. Yleensä kyseessä ovat *H. aphrophilus* tai *H. parainfluenzae*. Myös muita hemofilusten aiheuttamia satunnaisia infektioita tavataan. (Kilian 2003: 623-625; Kasper – Barlam 2005: 867-868.)

4.1.2 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Actinobacillus-lajit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, vaativia, kokkimaisia sauvabakteereja. Ne ovat gramnegatiivisia, mutta värjäytyminen voi olla epätasaista. Gramvärjäyksessä bakteerit voivat olla yksittäin, pareina tai lyhyinä ketjuina. *A. actinomycetemcomitans* tarvitsee kasvaakseen rikkaan kasvualustan ja mielellään 5-10 % hiilidioksidiatmosfääriin. Viljely tehdään veri- tai suklaamaljalle ja inkubaatioajan on oltava vähintään 24 tuntia. Kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen pesäkkeet ovat halkaisijaltaan 1 mm kokoisia ja niiden keskellä voidaan usein havaita bakteerille ominainen tähtikuvio. Se voidaan nähdä alta valaisevan maljamikroskoopin avulla, jos bakteeri on kasvatettu siihen sopivalla alustalla. Pesäkkeet ovat yleensä kunnolla kiinni agarin pinnassa ja niitä voi olla vaikea poimia. Joissain tapauksissa bakteerit saattavat tuottaa limaa ympärilleen, jolloin pesäkkeet ovat myös limaisia. Lajin optimi kasvatuslämpötila on 37°C. Veriviljelyissä kasvu saattaa olla hidasta ja siksi endokardiittipotilailta otettuja veriviljelystä pitäisi kasvattaa ainakin kaksi viikkoa (Vuoento – Kujala 2003: 206). *A. actinomycetemcomitans* on katalaasipositiivinen, ureaasi-, indoli-, eskuliini- ja sitraattinegatiivinen. Oksidaasireaktio on usein heikko. *A. actinomycetemcomitans* fermentoi glukoosia. Mannitoli-, maltoosi- ja ksyloositulokset voivat vaihdella. Tunnistuksessa voidaan käyttää esimerkiksi RapID NH -paneelia. (von Graevenitz – Zbinden – Mutters 2003: 609-610; Hall 1995: 535; HUSLAB 2005; Standards Unit 2005b: 6.)

Suun normaaliflooraan kuuluva *A. actinomycetemcomitans* voi aiheuttaa endokardiitteja, vaikeita paradontiitteja (hampaiden tukikudoksen tulehdus) ja pehmytkudosinfektioita. Noin 30 % aktinomykoosileesioista tehdyistä viljelyistä löytyy *A. actinomycetemcomitans*. Henkilöillä, joille *A. actinomycetemcomitans* aiheuttaa endokardiitin, on usein

myös vakava hammassairaus ja piilevä sydänlappävika. *A. actinomycetemcomitans* aiheuttaa myös muun muassa aivokalvontulehdusta, sylkirauhasen tulehdusta ja keuhkokuumetta. (Kasper – Barlam 2005: 868; Vuento – Kujala 2003: 206.)

4.1.3 *Cardiobacterium hominis*

Cardiobacterium-suvun ainut laji on *Cardiobacterium hominis*. *C. hominis* on liikkumaton, fakultatiivisesti anaerobinen gramnegatiivinen sauvabakteeri. Gramvärjäystulos saattaa olla joskus virheellisesti positiivinen. Bakteerit voivat muodostaa ruusukemaisia, aaltoilevia tai tikkumaisia kuvioita. *C. hominis* kasvaa veri- ja suklaamaljalla ja vaatii hiilidioksidiatmosfääriin. Viljeltäessä 37°C:ssa pesäkkeet ovat kahden vuorokauden kulluttua halkaisijaltaan 1 mm kokoisia ja himmeitä. Verimaljalla bakteerit aiheuttavat alfa-hemolyysiä. Lisäksi *C. hominis* saattaa muodostaa kuoppia agariin. Laji fermentoi glukoosia, mannitolia, sakkaroosia ja maltoosia. Se on oksidaasi- ja indolipositiivinen sekä katalaasi-, gelatiini-, nitraatti-, eskuliini- ja ureaasinegatiivinen. Bakteerin voi sekoittaa *Pasteurella multocida*an, koska Api20NE antaa 99,9 prosenttisesti tämän vaihtoehdon (Puohiniemi 2006). Samoin bakteeripesäkkeen muoto ja haju muistuttavat *P. multocida*a. (von Graevenitz ym. 2003: 616; Hall 1995: 535.)

C. hominis kuuluu nenän, suun ja nielun normaaliflooraan. *C. hominis* aiheuttaa endokardiittia etupäässä henkilöille, joilla on piilevä lappävika tai proteesilappä. Muista HACEK-bakteereista poiketen *C. hominis* aiheuttaa yleensä aorttaläpän tulehdusta. Usein diagnoosivaiheessa infektio on jo pitkälle kehittynyt. *C. hominis* voi aiheuttaa myös aivokalvontulehdusta. (Kasper – Barlam 2005: 868; Hall 1995: 535-536.)

4.1.4 *Eikenella corrodens*

Eikenella corrodens on fakultatiivisesti anaerobinen, gramnegatiivinen, suora sauvabakteeri. Se tarvitsee hiilidioksidirikkaan kasvu ympäristön ja hemiä kasvualustaansa (Hall 1995: 536). Kahden vuorokauden kasvatuksen (37°C) jälkeen pesäkkeet ovat halkaisijaltaan 1-2 mm. Niissä on selkeä keskiosa ja sitä ympäröivä matalampi kasvusto (Standards Unit 2005b: 6). Usein bakteeri tekee kuoppia agarin pintaan. Pesäkkeet haasevat hypokloriitille, ja usean vuorokauden kasvatuksen jälkeen ne muuttuvat kellertäviksi. Oksidaasi- ja nitraattipositiivisen, ja katalaasinegatiivisen pesäkkeen tunnistami-

seen riittää positiivinen ODC-testi (Roscon kiekko). Vaihtoehtona on käyttää esimerkiksi RapID NH -paneelia. (von Graevenitz ym. 2003: 615; HUSLAB 2005.)

E. corrodens on suun ja nenänielun normaaliflooraan kuuluva bakteeri. Useimmiten se aiheuttaa infektioita yhdessä muiden bakteerien kanssa. *E. corrodens* aiheuttaa muun muassa haavainfektioita, endokardiittia ja pehmytkudosinfektioita. (Kasper – Barlam 2005: 868.)

4.1.5 Kingellat

Kingellat ovat fakultatiivisesti anaerobeja, gramnegatiivisia, lyhyitä sauvoja, jotka esiintyvät joko pareittain tai lyhyinä ketjuina. *Kingella*-sukuun kuuluu kolme lajia: *K. kingae*, *K. indologenes* ja *K. denitrificans* (Kelly – Sinave 2005). Niiden gramvärjäytyvyys on usein epätasaista. Hiilidioksidiatmosfääri ei ole välttämätön kingellan viljelyssä, mutta se tehostaa kasvua. Pesäkkeet kasvavat kahdessa vuorokaudessa halkaisijaltaan 1-2 mm kokoisiksi. Jotkin kannat aiheuttavat agarin pintaan kuoppia. *K. kingae* voi muodostaa kahdentyyppisiä pesäkkeitä, joko leviäviä tai sileitä ja kuperia. Pesäkkeiden ympärillä on ohut β -hemolyyttinen alue. Usein pesäkkeet ovat limaisia johtuen bakteerisolujen kapseloitumisesta. Lisäksi *K. kingae* voi tuottaa ruskean keltaista pigmenttiä, toisin kuin muut kingellat. Kingellan viljely on usein hankalaa. Jos viljely tehdään alueelta, jossa on normaaliflooran bakteereja, voidaan käyttää selektiivistä klindamysiiniä tai vankomysiiniä sisältävää elatusainetta. Kingellat voivat myös kasvaa neisserioille tarkoitetulla selektiivisellä maljalla. (von Graevenitz ym. 2003: 614-615; Standards Unit 2005b: 7-8; Hall 1995: 536.)

Kingellan identifikaatiossa voidaan käyttää esimerkiksi RapID NH -testiä (HUSLAB 2005). Kingellat ovat oksidaasiposiitivisia, katalaasi- ja ureaasinegatiivisia, ja ne fermentoivat glukoosia ja muita sokereita. *K. denitrificans* kuuluu kolistiiniresistentteihin bakteereihin. Se voidaan rutiinidiagnostiikassa vahingossa sekoittaa *Neisseria gonorrhoeae* -bakteeriin, sillä ne muistuttavat morfologialtaan hyvin paljon toisiaan. Erotuksessa voidaan käyttää avuksi muun muassa katalaasi- ja nitraattitestistä. *K. denitrificans* on katalaasinegatiivinen ja nitraattiposiitivinen, ja se fermentoi glukoosia. *K. indologenes* on kokkimaisempi kuin *K. denitrificans*. Se eroaa *K. denitrificansista* myös olemalla indoliposiitivinen ja fermentoimalla maltoosia ja sakkaroosia. *K. kingae* fermentoi

glukoosia ja maltoosia. (Hall 1995: 536; Centers for Disease Control and Prevention 2006; HUSLAB 2005.)

Kingellat kuuluvat ihmisillä hengitysteiden normaaliflooraan. *K. kingae* on suvun yleisin patogeeni ja suuri osa sen aiheuttamista infektioista todetaan nuorilla ja lapsilla. Yleisin infektio on niveltulehdus. *K. kingae* aiheuttaa myös endokardiitteja ja bakteermioita. (Vuoento – Kujala 2003: 204.)

4.2 *Capnocytophaga*-suku

Capnocytophaga-sukuun kuuluu seitsemän bakteerilajia. Nämä lajit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, kasvuolosuhteiltaan vaativia sauvabakteereja. Ne ovat pääosin sukku-
lan muotoisia, mutta myös kaarevia, kokkimaisia ja lieriömäisiä muotoja on tavattu. Primaariviljelyssä useimmat kannat vaativat 5-10 % hiilidioksidiatmosfäärin ja ravinne-
rikkaan kasvualustan. Pesäkkeet kasvavat halkaisijaltaan 2-3 mm kokoisiksi 2-4 vuoro-
kaudessa 37°C:n lämpötilassa. Ne ovat litteitä ja yleensä hieman kellertäviä. Maljan
pinnalla bakteeri voi levitä sormimaisesti, vaikka flagellat yleensä puuttuvat (Hall 1995:
536). *Capnocytophaga*-lajit fermentoivat sakkaroosia, glukoosia, maltoosia ja laktoosia.
Ne voivat olla nitraatti- ja eskuliiniposiitivisia. Identifioinnissa voidaan käyttää RapID
ANA -paneelia (HUSLAB 2005). (von Graevenitz ym. 2003: 612.)

C. ochracea, *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. haemolytica* ja *C. granulosa* ovat tavallisia
ihmisen suun bakteereja. Ne voivat aiheuttaa esimerkiksi plakkia hampaisiin, periodon-
tiittia, endokardiittia ja verenmyrkytystä. Nämä lajit ovat oksidaasi- ja katalaasinegatiivisia. *C. haemolytica* on betahemolyyttinen. *C. granulosa* kasvaa aerobisessa ilmastossa. Oksidaasi- ja katalaasiposiitiviset *C. canimorsus* ja *C. cynodegmi* esiintyvät pääasiassa koirien ja kissojen suuontelossa. Ne voivat aiheuttaa rajun sepsiksen tai meningiitin eläimen pureman seurauksena, erityisesti kun kyseessä on immuunipuutteinen henkilö (HUSLAB 2005). (von Graevenitz ym. 2003: 612.)

4.3 *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis on fakultatiivisesti anaerobinen sauvabakteeri. Sen gramvärjäytyvyys vaihtelee. *G. vaginalis* voi aiheuttaa useita erilaisia infektioita, mutta useimmiten

sitä tavataan bakteeriperäisen vaginiitin yhteydessä. Vaikka *G. vaginalis* kuuluu emättimen normaaliflooraan, voi se lisääntyessään aiheuttaa tulehduksen. Näin voi tapahtua, kun emättimen *Lactobacillus*-bakteerien määrä laskee, jolloin limakalvon pH nousee. pH:n kohoamista yli 4,5 pidetään tulehduksen merkinä. Emättimen soluja mikroskopoidessa voidaan nähdä Clue-soluja eli levyepiteelisoluja, joiden pinnalla on bakteereja. Solujen pinnalla olevat bakteerit antavat niille hieman repaleisen ulkonäön. Bakteerivaginiitin oireita ovat lisääntynyt valkovuoto ja paha haju. Oireet johtuvat emättimen bakteerikannan muuttumisesta. Tulehdukseen liittyy *G. vaginalis* ohella usein myös muita bakteereita kuten *Mobiluncus*, *Bacteroides* ja *Peptostreptococcus*. (Curran 2006; Nauschuetz – Kwa – Pentella 1995: 977; Thomson – Miller 2003: 315.)

G. vaginalis kasvaa muun muassa lampaanverimaljalla ja suklaamaljalla. Anaerobiosissa *G. vaginalis* hemolysoi AV (aivo-veri) -maljalla, mutta ei FAA (fastidiuos anaerobes agar) -maljalla. Puhdasviljelmästä bakteeri voidaan identifioida esimerkiksi RapID NH:n avulla. *G. vaginalis* on katalaasi-, nitraatti-, ureaasi- ja eskuliininegatiivinen. Se fermentoi glukoosia ja maltoosia. Sakkarosin käyttö vaihtelee. (Nauschuetz ym. 1995: 977; Funke – Bernard 2003: 483; Puohiniemi 2006.)

4.4 Kampylobakteerit

Campylobacter-sukuun kuuluu 16 eri lajia. Kampylobakteerit ovat sukua *Arcobacter* ja *Sulfurospirillum* -ryhmien lajeille. Termofiilisten enteropatogeenisten kampylobakteerien ryhmään kuuluvat *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ja *C. upsaliensis*. Näille bakteereille on ominaista kasvu korkeassa lämpötilassa (42°C). Useimmat kampylobakteerilajit ovat mikroaerobisia. Nämä lajit kasvavat parhaiten ilmastossa, jossa on 5 % happea, 10 % hiilidioksidia ja 85 % typpeä. (Nachamkin 2003: 902, 905; Rautelin 2003: 215.)

Ripulipotilaalta tehdään ulosteviljely selektiiviselle kampylobakteerimaljalle, kun epäillään kampylobakteeri-infektiota. Viljelmää kasvatetaan mikroaerofiilisessä ilmastossa 42°C:n lämpötilassa. Maljalla bakteeri muodostaa yleensä harmaita ja matalia pesäkkeitä. Kampylobakteerit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja. Ne voivat näkyä värjäyksessä pilkun, s-kirjaimen tai lokinsiipikuvion muotoisina. Kokkimaisia muotoja tavataan erityisesti vanhoissa viljelmissä. Hippuraattitestiä voidaan käyttää, kun halutaan erottaa *C. jejuni* muista kampylobakteerilajeista. *C. jejuni* on hippuraatti- ja oksidaasiposiitivinen. (Nachamkin 2003: 902, 905; Rautelin 2003: 215-216.)

Kampylobakteeri-infektio on zoonoosi. Kampylobakteereja esiintyy eläinten suolistossa, josta bakteeri voi päästä lihaan esimerkiksi teurastuksen yhteydessä. *C. jejuni* ja *C. coli* ovat yleisimpiä infektioita aiheuttavia kampylobakteereja. Muut lajit ovat harvinaisempia. Näitä lajeja ei löydetä tavallisilla kampylobakteerien rutiinidiagnostiikan menetelmillä, koska ne eivät yleensä kasva selektiivisillä kampylobakteerialustoilla tai korkeassa lämpötilassa. Kampylobakteeri-infektiot ovat yleensä yksittäistapauksia. Suurin osa Suomessa diagnosoiduista tartunnoista on peräisin ulkomailta. Usein sairastunut henkilö on syönyt huonosti kypsennettyä ruokaa, esimerkiksi kanaa. Kampylobakteeriepidemiat ovat Suomessa olleet yleensä saastuneen juomaveden aiheuttamia. Kampylobakteerit aiheuttavat suolistoinfektion, kampylobakterioosin, johon liittyy limainen tai verinen ripuli, kuumetta, päänsärkyä ja vatsakipuja. Oireet kestävät yleensä noin kolme vuorokautta. Tauti paranee usein itsestään, mutta antibiootihoidolla voidaan lyhentää taudin kestoa. Kampylobakteerin aiheuttama suolistoinfektio voi laukaista seuraavien viikkojen aikana reaktiivisia infektioita, jotka yleensä kuitenkin paranevat itsestään. Yleisimpiä ovat nivel- ja silmäinfektiot. Harvinaisempi jälkitauti on halvausoireita aiheuttava Guillain-Barrè-oireyhtymä. (Rautelin 2003: 217; Maa- ja metsätalousministeriö 2005.)

C. fetus on harvinainen opportunistinen taudinaiheuttaja. Se aiheuttaa tavallisimmin yleisinfektioita. *C. fetus* -lajin tärkein virulenssitekijä on sen proteiinikapseli, joka suojaaa bakteeria muun muassa fagosytoosilta. (Nachamkin 2003: 903.)

4.5 Moraksellat

Moraxella-sukuun kuuluvat lajit ovat gramnegatiivisia, oksidaasi- ja katalaasipositiivisia sauva- ja kokkibakteereja. Ne esiintyvät yleensä pareittain ja joskus lyhyinä ketjuina. Niiden värjäytyvyys on usein epätasaista. Moraksellat vaativat aerobiset kasvuolosuhteet (Hall 1995: 532). *M. nonliquefaciens* muodostaa sileitä, läpikuultavia tai lievästi himmeitä pesäkkeitä. Pesäkkeet ovat halkaisijaltaan noin 1 mm kokoisia kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen lampaanverimaljalla. Bakteeri voi myös muodostaa kuoppia agarin pintaan. *M. lincolnii*, *M. osloensis* ja *M. phenylpyruvica* muodostavat samantaisia pesäkkeitä, mutta muodostavat vain harvoin kuoppia. *Moraxella catarrhalis* eroaa muista morakselloista. Se on ainut kokkimainen *Moraxella*, jota on löydetty ihmisistä. *Moraxella catarrhalis*-lajin nimi on vaihdellut paljon. Sen aikaisempia nimiä ovat muun muassa *Micrococcus* ja *Neisseria catarrhalis*. *M. catarrhalis* -lajin tunnistaminen perus-

tuu gramvärjykseen ja kykyyn hajottaa DNA:ta ja tributyriiniä. Pesäkkeille on tyypillistä liukuminen agarin pinnalla, jos niitä työntää viljelysauvalla. *Moraxella catarrhalis* kasvaa sekä lampaanverilevällä suklaamaljalla (Long – Thomas – Barnishan 1995: 409). *Moraxella catarrhalis* -lajia lukuun ottamatta monet laboratoriot eivät identifioi morakkelloja lajitasolle sillä niiden patogeeninen merkitys on samankaltainen. Lisäksi monet kannat ovat kasvatusolosuhteitaan vaativia ja biokemialliset reaktiot ovat negatiivisia tai vaikeasti tulkittavissa. (Schreckenberger ym. 2003: 754; Vuento – Kujala 2003: 203; Janda – Knapp 2003: 586-588.)

M. osloensis, *M. nonliquefaciens* ja *M. lincolnii* kuuluvat ihmisen hengitysteiden normaaliflooraan. Nämä lajit, kuten useimmat muutkin *Moraxella*-lajit, aiheuttavat vain harvoin infektioita kuten meningiittia ja endokardiittia. *M. catarrhalis* voidaan löytää hengitysteiden limakalvoilta pieneltä osalta terveistä aikuisista. Lapsista sitä on jopa puolella. Hengitysteiden infektiot ovat yleisimpiä *M. catarrhalis*-lajin aiheuttamia infektioita. Lisäksi se voi aiheuttaa muun muassa endokardiittia, meningiittia, silmäinfektioita ja haavainfektioita. (Schreckenberger ym. 2003: 754; Janda – Knapp 2003: 588-589.)

4.6 Neisseriat

Neisseriat ovat gramnegatiivisia bakteereja, jotka esiintyvät pareittain tai lyhyinä ketjuina. Jotkin diplokokkilajit näyttävät gramvärjyksessä kahvinpavulta. *Neisseria*-lajit, lukuun ottamatta *N. weaveria* -lajia ja joitakin *N. elongata* -alalajeja, ovat *Neisseriaceae*-heimon ainoita kokkibakteereja. Vaikka *N. elongata* ja *N. weaveria* kuuluvat *Neisseria*-sukuun, ne ovat sauvabakteereja ja muistuttavat paljon nonfermentatiivisia gramnegatiivisia sauvabakteereja (Schreckenberger ym. 2003: 755). Neisseriat ovat aerobisia bakteereja ja useimpien lajien optimi kasvulämpötila on 35-37°C. Jotkin lajit vaativat hiilidioksidi-ilmaston kasvaakseen. Neisseriat fermentoivat sokereita. Ne ovat oksidaasi- ja katalaasipositiivisia lukuun ottamatta muutamaa *N. elongata* -alalajia. Patogeeniset *Neisseria*-lajit kuten *N. gonorrhoeae* vaativat muita neisserioita rikkaamman kasvualustan. Gonokokin viljelyä varten on erilaisia selektiivisiä maljoja. Nämä maljat edistävät patogeenisten neisserioiden kasvua ja estävät taas muiden neisserioiden ja bakteerilajien kasvua. On tärkeää osata erottaa *N. gonorrhoeae* muista selektiivisellä maljalla mahdollisesti kasvavista bakteereista. Esimerkiksi *N. meningitidis* voi kasvaa tällaisella maljalla. Maljoja kasvatetaan 35°C:n lämpötilassa hiilidioksidipitoisessa ja kosteassa

atmosfäärissä kaksi vuorokautta. Alustava identifiointi perustuu gramvärjäykseen ja oksidaasireaktioon. Sokeritestit eivät ole aina luotettavia ja siksi bakteeri tulee varmentaa joko spesifisillä vasta-aineilla tai DNA-koettimella. (Janda – Knapp 2003: 591; Vuento – Rostila 2003: 158.)

Ihmisillä tavattavia neisserioita ovat *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. mucosa*, *N. flavescens*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea* ja *N. elongata* -alalajit *elongata*, *glycolytica* ja *nitroreducens*. Muita neisserioita löytyy eläimistä. Esimerkiksi *N. weaveri* ja *N. canis* ovat osa koirien hengitysteiden normaaliflooraa. Useimmat ihmisistä löytyvät *Neisseria*-lajit kuuluvat hengitysteiden normaaliflooraan. Sitä vastoin *N. gonorrhoeae* on aina patogeeni. Sitä tavataan vain ihmisillä (Long ym. 1995: 392). *N. gonorrhoeae* aiheuttaa tippuria. Pienellä osalla sairastuneista bakteeri voi päästä verenkiertoon ja aiheuttaa muun muassa iholeesioita, jännetupentulehdusta, endokardiittia ja meningiittiä. Lisäksi se voi aiheuttaa silmäinfektioita, erityisesti vastasyntyneille. *N. meningitidis* voi kolonisoida nenänielua pienellä osalla ihmisistä ilman oireita, mutta se myös aiheuttaa vakavia tauteja kuten meningiittiä ja enkefaliittiä. (Janda – Knapp 2003: 586-588.)

4.7 Oligellat

Oligella-sukuun kuuluu kaksi lajia: *O. urethralis* ja *O. ureolytica*. *O. urethralis* tunnettiin aikaisemmin nimellä *Moraxella urethralis*. Oligellat ja moraksellat ovat lähisukulaisia. Ne molemmat ovat gramnegatiivisia, asakkarolyttisiä, pieniä ja lyhyitä sauva-bakteereja. *O. ureolytica* -lajilla on flagella, jonka avulla se pystyy liikkumaan. *O. ureolytica* ja *O. urethralis* muodostavat vaaleita ja himmeitä pesäkkeitä. *O. ureolytica* on hidaskasvuinen ja muodostaa selviä pesäkkeitä verimaljalle kolmen vuorokauden aikana. Sille on tyypillistä nopea ureaasireaktio. Molemmat *Oligella*-lajit ovat oksidaasi-, katalaasi- ja nitraattiposiitiivisia. Oligellat aiheuttavat urosepsistä. Lisäksi *O. urethralis* aiheuttaa septistä niveltulehdusta. (Schreckenberger ym. 2003: 754-755; HUSLAB 2005.)

4.8 Pasteurellat

Pasteurellat kuuluvat *Actinobacillus*-lajien ohella *Pasteurellaceae*-heimoon. Molemmat ryhmät esiintyvät eläimillä ja osa ryhmien lajeista myös ihmisillä. Pasteurellat ovat kokkimaisia, pieniä, liikkumattomia, fakultatiivisesti anaerobeja, gramnegatiivisia sauvabakteereja. Niiden värjäytyminen on usein epätasaista. Bakteerit esiintyvät yksittäin, pareina ja lyhyinä ketjuina. Pasteurellat ovat vaativia kasvuolosuhteiltaan ja jotkin lajit tarvitsevat V-tekijää (NAD-molekyyli) kasvaakseen. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen pesäkkeet ovat halkaisijaltaan 1-2 mm kokoisia, kun viljely on tehty verimaljalle ja kasvatus tapahtuu 37°C:ssa. Pesäkkeet ovat usein harmaita ja sitkaita. β -hemolyysiä aiheuttavat vain *P. haemolytica* ja *P. trehalosi*. Suklaamalja ei erityisesti lisää bakteerin kasvua. Pasteurellojen seulonnassa voidaan käyttää vankomysiiniä, klindamysiiniä ja/tai amikasiinia sisältävää kasvatusalustaa. Useimmat *Pasteurella*-lajit ovat oksidaasi-, katalaasi- ja nitraattiposiitivisia. Lajit fermentoivat glukoosia ja muita sokereita, mutta eivät tuota kaasua. Tunnistuksessa voidaan käyttää esimerkiksi RapID NH tai RapID NF Plus System -testipaneeleja (HUSLAB 2005). (Standards Unit 2005b: 5; von Graevenitz ym. 2003: 611-612.)

Pasteurellat ovat yleisiä sekä koti- että villieläimillä. Ne viihtyvät parhaiten ylähengitysteissä. *P. multocida* on yleisin ihmisillä infektoita aiheuttava pasteurella. Sillä on kolme alalajia: *multocida*, *septica* ja *gallicida*. Ne voidaan erottaa toisistaan sorbitoli- ja dulcitoltesteillä. Muita kliinisistä näytteistä löydettäviä *Pasteurella*-lajeja ovat *P. canis*, *P. stomatis* ja *P. dagmatis*. Useimmiten näitä löydetään haavoista tai paiseista, jotka ovat seurausta koiran tai kissan puremista tai raapimisesta. Pasteurellat aiheuttavat myös muun muassa meningiittia, endokardiittia ja peritoniittia. Keuhkojen kolonisoitumista tavataan henkilöillä, joilla on piilevä keuhkosairaus. (von Graevenitz ym. 2003: 611-612.)

5 MUUT TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT BAKTEERILAJIT

Aeromonas, *Citrobacter*, *Morganella* ja *Yersinia* -suvun bakteerit kuuluvat enterobakteereihin (HUSLAB 2005). Niitä ei voida jakaa aiemmin mainittuihin bakteeriryhmiin. *Aeromonas*, *Citrobacter* ja *Morganella* -lajit voivat kuulua ESBL-kantoihin, mutta

CLSI-standardin mukaiset ESBL:n tunnistusmenetelmät ovat tarkoitettu vain *Escherichia coli*, *Klebsiella* tai *Proteus mirabilis* -lajeille (Schwaber ym. 2004).

5.1 Aeromonakset

Aeromonakset ovat fakultatiivisesti anaerobeja, gramnegatiivisia sauvabakteereja. Geneettisillä menetelmillä niistä voidaan erottaa 16 eri ryhmää. Osa *Aeromonas*-lajeista voidaan tunnistaa myös fenotyyppisten ominaisuuksien perusteella. (Rautelin 2003: 218.)

Aeromonakset ovat yleisiä luonnonvesissä. Ne aiheuttavat monenlaisia sairauksia tasalämpöisillä ja vaihtolämpöisillä eläimillä kuten kaloilla, matelijoilla ja nisäkkäillä. Ihmisillä aeromonakset aiheuttavat infektoita esimerkiksi haavoissa, silmissä ja korvakäytävässä. *Aeromonas* voi lisäksi aiheuttaa sepsistä erityisesti immunosupprimoiduilla potilailla. Usein *Aeromonas* löytyy myös ripulin yhteydessä ulosteesta. Yleisimpiä ripuliulosteesta löydettäviä *Aeromonas*-lajeja ovat *A. caviae*, *A. hydrophila* ja *A. veronii sobria*. Yleensä on kyse vesiripulista, mutta myös rajumpaa ja kroonista muotoa tavataan. Aeromonaksen merkitys ripulin aiheuttajana on kuitenkin vielä epäselvä. (Rautelin 2003: 218; Carnahan – Kaplan 1995: 499.)

Aeromonakset kasvavat hyvin normaaleilla bakteeriviljelymaljoilla sekä ulosteviljelymaljoilla. Vuorokauden inkubaation aikana 35-37°C lämpötilassa maljalle muodostuu isoja, kuperia ja himmeitä pesäkkeitä, jotka yleensä haisevat voimakkaasti. Pesäkkeiden väri voi vaihdella vaaleasta ruskeankeltaiseen. Useat *Aeromas*-lajit aiheuttavat betahe-molyysiä verimaljalla. Aeromonakset ovat oksidaasipositiivisia ja ne fermentoivat glukosia. (Carnahan – Kaplan 1995: 501.)

5.2 *Citrobacter*-suku

Citrobacter-sukuun kuuluvat *C. freundii*, *C. diversus* ja *C. amalonaticus*. Ne ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja. *Citrobacter*-lajit voivat kolonisoida immuunipuolustukseltaan heikentyneitä potilaita. Ne ovat opportunisteja taudinaiheuttamiskyvyltään ja niitä esiintyy sairaalapotilailla virtsatie- ja hengitystieinfektioissa. *C. freundii* voidaan tunnistaa sokerisarjan avulla. Useimmat kannat ovat liikkuvia, mannitoli-, ONPG- ja

H₂S-positiivisia. Lisäksi *C. freundii* tuottaa kaasua ja fermentoi glukoosia, laktoosia sekä arabinoosia. (Tissari – Anttila 2003a: 194; HUSLAB 2005: 3.)

5.3 Morganellat

Morganellat kuuluvat *Proteus* ja *Providencia* -sukujen ohella *Proteeae*-ryhmään. Nämä lajit kolonisoivat usein suolistoa ja ovat taudinaiheuttamiskyvyltään opportunisteja. Ne aiheuttavat muun muassa virtsatie- ja haavainfektioita. *Morganella*-sukuun kuuluu vain yksi laji, *Morganella morganii*. Se tunnettiin aikaisemmin nimellä *Proteus morganii*. *M. morganii* on gramnegatiivinen sauvabakteeri. Se voi aiheuttaa virtsatieinfektion ohella muun muassa sepsistä, keuhkokuumetta ja haavainfektioita. Tunnistuksessa voidaan käyttää sokerisarjaa. Useimmat *M. morganii* -kannat ovat liikkuvia sekä indoli-, ureaasi- ja ornitiiniposiitivisia. Lisäksi *M. morganii* fermentoi glukoosia ja tuottaa kaasua. (Tissari – Anttila 2003a: 194; HUSLAB 2005: 3; Miller 2005.)

5.4 *Yersinia*-suku

Yersinia-sukuun kuuluvat bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja. Yersiniat ovat eläinten suoliston alueen bakteereja eli enterobakteereja. Kaikilla muilla *Yersinia*-suvun bakteereilla paitsi *Y. pestis* -lajilla on flagelloja. Tästä johtuen kaikki muut *Yersinia*-lajit paitsi *Y. pestis* ovat liikkumaan kykeneviä. Yersiniat pystyvät lisääntymään niin aerobioosissa kuin anaerobioosissakin. Tautia aiheuttavilla *Yersinia*-kannoilla on plasmidissa virulenssigeeni, joka sisältää monia eri virulenssitekijöitä. Kliinisesti tärkeitä *Yersinia*-lajeja ovat *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. pestis*. Suurin osa *Yersinia*-suvun bakteereista on indolinegatiivisia. Yersinioista ainoastaan *Y. pestis* on ureanegatiivinen. Yersiniat ovat rikkinegatiivisia ja lähes aina myös sitraattinegatiivisia. Ne ovat useimmiten glukoosi- ja mannitoliposiitivisia. Niiden tunnistuksessa käytetään selektiivistä CIN-maljaa (Cefsulodin Irgasan Novobiocin) (BD 2001). (Siitonen – Vaara 2003: 189-191; Bockemühl – Wong 2003: 672-675; bioMérieux 2004a.)

Virulenssiplasmidin omaavat *Y. enterocolitica* -kannat aiheuttavat monimuotoisia suoliston alueen infektioita. Tartunta tapahtuu usein saastuneen ruoan välityksellä. *Y. pseudotuberculosis* on virulenssiominaisuuksiltaan samankaltainen kuin *Y. enterocolitica*. Se aiheuttaa joskus ihmiselle septisen infektion, varsinkin sellaisille henkilöille, joiden maksan toiminta on huonontunut. *Yersinia pestis* on ruton aiheuttajabakteeri. *Y. pestis*

omaa yersinioille tyypillisen virulenssiplasmidin lisäksi kaksi muuta virulenssiplasmidia. Se on tyypillinen jyrsijöiden infektioiden aiheuttaja. Tartunta jyrsijästä ihmiseen tapahtuu kirpun välityksellä. Tällaisen tartunnan tavallisin ilmenemismuoto on paiserutto. Tauti voi nopeasti kehittyä sepsikseksi, jos sitä ei hoideta. *Y. pestis* voi myös aiheuttaa paiseruttoa vaarallisemman keuhkoruton, joka voi levitä ihmisestä toiseen pisaratartuntana. (Siitonen – Vaara 2003: 189-191; Bockemühl – Wong 2003: 675-676.)

6 BAKTEERI-IDENTIFIKAATIOMENETELMÄT RUTIINIDIAGNOSTIIKASSA

Suurin osa opinnäytetyössä käyttämistämme bakteereista oli identifioitu kaupallisilla Api® 20 E, Api® 20 NE, RapID™ ANA II System, RapID™ NH System ja RapID™ NF Plus System -testeillä. RapID ANA II System -testiä oli käytetty harvemmin. Työsämme ei käsitellä tarkemmin muita rutiinidiagnostiikassa käytettäviä tunnistustestejä kuten sokerisarjaa, oksidaasitestiä ynnä muita sellaisia, koska lopullinen bakteeridentifikaatio oli useimmiten varmistettu kaupallisia Api ja RapID -testejä hyväksikäyttäen. Api20E ja Api20NE -testitulokset ovat valmiina noin vuorokauden sisällä. RapID-testit ovat entsyymaattisiin reaktioihin perustuvia pikatestejä. Niiden antamat tulokset ovat yleensä valmiita neljässä tunnissa.

6.1 Api® 20 E

Api20E on suunniteltu tunnistamaan enterobakteereja ja muita kasvatusolosuhteiltaan tavallisia gramnegatiivisia sauvabakteereja. Api20E sisältää 21 bakteerien identifikaatiossa käytettävää biokemiallista testiä, jotka perustuvat muun muassa entsyymaattisiin reaktioihin, substraattien hyväksikäyttöön, kemiallisten aineiden tuottoon tai fermentaatioon. Testitulosten lukeminen tehdään esimerkiksi Apiweb-tietokantaa apuna käyttäen (bioMérieux SA 2006). (bioMérieux 2004a.)

Api20E-testiliuska koostuu 20 testikaivosta, jotka sisältävät kuivattuja substraatteja. Näihin substraatteja sisältäviin kaivoihin lisätään tutkittavaa bakteerisuspensiota. Inkuboinnin aikana kaivoissa tapahtuu bakteerimetabolian seurauksena värimuutoksia, jotka ovat osassa tapauksia seurausta pH:n muutoksesta. Tapahtuneet reaktiot luetaan inkuboinnin aikana tapahtuneiksi.

baatioajan jälkeen. Kuviossa 3 Api20E-identifikaatiotestin kaikki reaktiot ovat jääneet negatiivisiksi. Kuviossa 4 esitetään, miltä positiiviset testireaktiot näyttävät jokaisessa testikaivossa. (bioMérieux 2004a.)

Testiliuskoja säilytetään uudelleensuljettavassa alumiinisessa pussissa 2-8 celciusasteen lämpötilassa. Pussi sisältää pienen kosteutta absorboivan kuiva-ainepussin. Testiliuskat säilyvät käyttökelpoisina korkeintaan kymmenen kuukautta alumiinipussin avaamispäivästä. (bioMérieux 2004a.)

Bakteerisuspension valmistusta varten tarvitaan 5 ml:n API NaCl 0,85 % ampulli, 5 ml:n API Suspensio Medium (elatusaine) tai 5 ml steriiliä keittosuolaliuosta. Elatusainemaljalta poimitaan samannäköisiä yksittäisiä pesäkkeitä ja suspensio sekoitetaan huolellisesti. (bioMérieux 2004a.)

Api20E -testikoteloon laitetaan noin viisi millilitraa vettä, jotta testireaktiot eivät kuivuisi inkubaation aikana. Testiliuska asetetaan koteloon ja täytetään bakteerisuspensiolla ohjeiden mukaisesti steriiliä pipettiä käyttäen. |CIT| (citrate utilization), |VP| (acetoin production) ja |GEL| (gelatinase) -kaivojen taskut täytetään bakteerisuspensiolla siten, että ne ovat pinnaltaan kuperia. Lopuista testeistä täytetään bakteerisuspensiolla vain kaivot. Lisäksi ADH (arginine dihydrolase), LDC (lysine decarboxylase), ODC (ornithine decarboxylase), H₂S (H₂S production) ja URE (urease) -kaivoihin luodaan anaerobiset olosuhteet tiputtamalla mineraaliöljyä kaivon päälle niin, että nesteen pinta on kupera. Inkubaatiokotelo suljetaan, ja sitä inkuboidaan 18-24 tuntia 36°C ±2°C:ssa. Inkubaatioajan päätyttyä tapahtuneet värireaktiot luetaan liuskalta. TDA (tryptophane deaminase) -testiin lisätään yksi tippa TDA-reagenssia ja IND (indole production) -testiin yksi tippa JAMES-reagenssia. VP-testiin lisätään yksi tippa VP1 ja yksi tippa VP2 -reagensseja. VP-testin tulos on valmis kymmenen minuutin kuluttua. (bioMérieux 2004a.)

Reaktioiden lukemisen yhteydessä merkitään tulosliuskalle positiiviset ja negatiiviset tulokset (+/-). Tulosliuska on jaettu kolmen testin ryhmiin. Viimeinen 21. testi on oksidaasitesti. Tuloksen ollessa positiivinen ryhmän ensimmäinen testi saa 1 pisteen, toinen 2 pistettä ja kolmas 4 pistettä. Nämä kolmen testin saamat pisteet lasketaan yhteen. Kaikkien ryhmien saamista pisteistä muodostuu 7-lukuinen numerosarja. Tämän numerosarjan perusteella tietokannasta saadaan tunnistettavan bakteerin nimi. Mikäli baktee-

rin nimi ei selviä kyseisellä numerosarjalla, voidaan tehdä vielä kuusi lisätestiä bakteerin nimen selvittämiseksi. (bioMérieux 2004a.)



KUVIO 3. Api20E-identifikaatiotestiliuskan negatiiviset testireaktiot (bioMérieux SA 2006).



KUVIO 4. Api20E-testiliuskan positiiviset testireaktiot (bioMérieux SA 2006).

6.2 Api® 20 NE

Api20NE on tarkoitettu gramnegatiivisten sauvabakteerien, kuten *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* ja *Aeromonas* identifioimiseen. Tunnistettavat bakteerit eivät saa kuulua *Enterobacteriaceae*-heimoon tai olla ”nirsoja”, kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja. (bioMérieux 2004b.)

Api20NE-testipaneeli sisältää 20 testikaivoa, joissa on kuivatettuja substraatteja. Testipaneelissa on kahdeksan konventionaalista testiä ja kaksitoista assimilaatiotestiä. Konventionaaliset testikaivot täytetään natriumkloridiin tehdyllä bakteerisuspensiolla, joka liuottaa reagenssit. Inkubaation aikana bakteeri metaboloii testikaivojen substraatteja ja tapahtuu värinmuodostumista. Joihinkin kaivoihin täytyy lisätä reagensseja värireaktion aikaansaamiseksi. Assimilaatiotesteissä tarkkaillaan bakteerin kykyä käyttää hyväkseen tiettyjä substraatteja ja kasvaa testikaivoissa. Testitulokset luetaan ohjeistuksen mukaisesti. Oksidaasireaktiotulos on oleellinen testituloksien tulkinnassa; se täytyy tehdä Api20NE -testin lisäksi. Kuviossa 5 näkyy Api20NE-identifikaatiotestin negatiiviset reaktiotulokset. Kuviossa 6 kaikkien testikaivojen reaktiot ovat positiivisia. Kuviossa on asetettu punaiset viivat assimilaatiotestikaivojen taakse, jotta positiiviset reaktiot erottuisivat paremmin. (bioMérieux 2004b.)

Api20NE testipakkaus sisältää testipaneeleja ja -kotelaita, API AUX Medium -ampulleja, tulosliuskoja ja ohjevihkon. Testipaneeleja ja API AUX Mediumia sisältäviä ampulleja säilytetään 2-8°C:ssa. Ennen testin suorittamista ne otetaan huoneenlämpöön. (bioMérieux 2004b.)

Testikotelon pohjalle kaadetaan vettä kostean ilmapiirin luomiseksi. Testiliuska laite-
taan paikoilleen kotelon pohjalle. Kahteen millilitraan 0,85 % NaCl:ia siirrostetaan 1–4 bakteeripesäkettä tai niin paljon, että suspensiosta tulee McFarland 0,5. On suositeltavaa käyttää tuoreita bakteeriviljelmiä. Bakteerisuspension oikea vahvuus on oleellinen testin onnistumiseksi; testit eivät ehkä toimi oikein, jos suspensio on liian vahva. Liian laimea suspensio voi taas aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia. NO₃ (potassium nitrate) –PNPG (para-nitrophenyl-βD-galactopyranosidase) -testikaivot täytetään bakteerisuspensiolla siten, että taskut eivät täyty. Ilmakuplien muodostumista on vältettävä. GLU (glucose fermentation), ADH ja URE -testien taskut täytetään anaerobisten olosuhteiden luomiseksi mineraaliöljyllä. (bioMérieux 2004b.)

API AUX Mediumia sisältävät ampullit ovat assimilaatiotestejä varten. Ampullit avataan, niihin siirrostetaan 200µl jäljelle jäänyttä natriumkloridisuspensiota ja sekoitetaan hyvin. Kaikki assimilaatiotestikaivot eli kaivot GLU (glucose assimilation) –PAC (phenylacetic acid assimilation) täytetään kokonaan suspensiolla siten, että pinta on hieman kupera. Liian vähän täytetyt tai ylitäydet kaivot saattavat aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Testikotelo suljetaan ja sitä inkuboidaan 29 ± 2°C:ssa 24 (± 2) tuntia. (bioMérieux 2004b.)

Testikaivoissa tapahtuvien reaktioiden nimet sekä negatiivisissa ja positiivisissa reaktioissa syntyvät värisävyt on merkitty testipakkauksen mukana tulevaan taulukkoon. Ne on myös nähtävissä Apiweb-tietokannassa. Inkubaation jälkeen voidaan itsenäisesti tapahtuneet reaktiot lukea ohjeen mukaisesti. NO₃ ja TRP (tryptophane) -testikaivoihin on vielä lisättävä reagensseja reaktioiden lukemista varten. (bioMérieux 2004b.)

NO₃-testi mittaa bakteerin kykyä pelkistää nitraattia. NO₃-testikuoppaan lisätään yksi tippa NIT1-reagenssia ja yksi tippa NIT2-reagenssia. Viiden minuutin päästä tulokset voidaan lukea. Punainen värisävy tarkoittaa positiivista reaktiota. Negatiiviselta näyttävä tulos saattaa johtua typen tuotosta. Negatiivisen tuloksen varmistamiseksi, testikuoppaan täytyy lisätä 2-3 mg sinkkiä. Testitulos on positiivinen, jos neste pysyy vielä vii-

den minuutin jälkeen värittömänä. Vaaleanpunainen värisävy tarkoittaa negatiivista reaktiota, koska silloin testikuoppaan on jäänyt nitraattia, jota bakteeri ei ole pystynyt pelkistämään. Sinkki pelkistää jäljelle jääneen nitraatin nitriitiksi. TRP-testikaivoon lisätään yksi tippa JAMES:n reagenssia. Vaaleanpunainen värisävy kertoo positiivisesta tuloksesta ja väritön tai vaaleanvihertävä negatiivisesta tuloksesta. (bioMérieux 2004b.)

Assimilaatiotesteissä havainnoidaan bakteerikasvun muodostumista. Silloin kun bakteeri on pystynyt kasvamaan testikuopassa, neste on muuttunut sameaksi. Kaikki testikaivot jaetaan kolmen ryhmiin. Jaon mukaan ensimmäiset testikaivot saavat numeron 1, toiset numeron 2 ja kolmannet numeron 4. Positiivisten testien numerot lasketaan ryhmittäin yhteen ja saatu numerosarja merkitään ylös. Apiweb-tietokanta vertaa numerosarjaa tunnettuihin tuloksiin bakteerin identifikaation saamiseksi. (bioMérieux 2004b.)



KUVIO 5. Api20NE-testin negatiiviset testireaktiot (bioMérieux SA 2006).



KUVIO 6. Api20NE-testin positiiviset testireaktiot (bioMérieux SA 2006).

6.3 RapID™ ANA II System

RapID ANA II System -testiä (kuvio 7) käytetään anaerobisten bakteerien identifikaatioon ihmisperäisistä näytteistä. RapID ANA II -testipaneelissa on kymmenen testikaivoa, jotka sisältävät kuivattuja reagensseja. Tutkittavaa organismia sisältävä suspensio saa testikaivoissa aikaan entsyymaattisia reaktioita, jotka havaitaan indikaattorin aiheuttamana värimuutoksena. Tulokset voidaan inkubaatioajan jälkeen tulkita positiivisiksi tai negatiivisiksi. Reaktiotuloksista saadaan numerosarja, jota verrataan tunnettuihin tuloksiin ja näin saadaan bakteerille nimi. (Remel 2004a.)

Testipaneelien lisäksi testin suorittamiseen tarvitaan RapID ANA II -reagenssia, joka toimitetaan yhdessä testipaneelin kanssa, RapID Inoculation Fluid -suspensionestettä ja RapID Spot Indole -reagenssia. RapID ANA II System ja RapID Spot Indole -reagenssi säilytetään alkuperäispakkauksissa 2-8°C:ssa. Testin suorittamisvaiheessa reagenssien tulee olla huoneenlämpöisiä. Jääkaapista otetut reagenssit tulee käyttää vuorokauden sisällä. RapID Inoculation Fluid -suspensioneste säilytetään alkuperäispakkauksessa huoneenlämmössä. (Remel 2004a.)

Tutkittavaa bakteeria tulee olla kasvatettu anaerobioosissa ja bakteerin tulee kasvaa viljelmässä puhtaana. Testi suositellaan tehtäväksi seuraavilla viljelymaljoilla kasvavista bakteeripesäkkeistä: CDC anaerobinen veriagar -malja, Columbia-malja, Brain Heart Infusion -malja, Lombard-Dowell-malja, tryptikaasi-soija-agar-malja, PEA (fenyylietyyli alkoholi agar), EYA (Egg Yolk -malja), PV (paromomysiini/vankomysiini-malja) ja KV (kanamysiini/vankomysiini-malja). (Remel 2004a.)

Bakteerisuspensiosta valmistetaan McFarland 3 vahvuinen sekoittamalla tarvittava määrä bakteeria pumpulitikulla tai silmukalla 1ml:aan RapID Inoculation Fluid -nestettä. Testipaneeli avataan ja koko suspensio siirrostetaan pipetoimalla paneelin oikeaan yläkulmaan. Testipaneelin kansi suljetaan ja paneelin etuosa nostetaan 45° kulmaan. Paneelia käännettäessä tässä asennossa puolelta toiselle ja lopuksi paneelin takaosa nostetaan 45° kulmaan, jolloin testikammiot täyttyvät suspensiolla. Testipaneelia inkuboidaan 35-37°C:ssa vähintään neljä ja korkeintaan kuusi tuntia. Bakteerisuspensiosta tehdään viljely jälkimaljalle, jonka avulla varmistetaan tutkittavan bakteerin kasvavan puhtaana suspensiossa. Maljaa inkuboidaan anaerobioosissa 35-37°C:ssa 18-24 tuntia. (Remel 2004a.)

Testipaneeli sisältää kymmenen testikaivoa, joista kahdeksan on kaksivaiheisia ja antavat näin kaksi erillistä testitulosta. Ensin luetaan kaikkien kymmenen testikaivon tulos. Tämän jälkeen testikaivoon 10 lisätään kaksi tippaa RapID Spot Indole -reagenssia ja testikaivoihin 3-9 lisätään kaksi tippaa RapID ANA II -reagenssia. Uudet testitulokset luetaan 30 sekunnin ja viimeistään kahden minuutin kuluttua reagenssien lisäyksestä. Saatua reaktiotulosten sarjaa verrataan tunnettuihin taulukon tai tietokannan testituloksiin ja näin saadaan bakteeri identifioitua. (Remel 2004a.)



KUVIO 7. RapID ANA II System (Remel 2002).

6.4 RapID™ NH System

RapID NH System -testiä (kuvio 8) voidaan käyttää neisserioiden, hemofilusten ja muiden kliinisistä näytteistä eristettyjen, ihmisperäisten bakteerien tunnistamisessa.

RapID NH System koostuu testipaneeleista, joissa on kymmenen testikaivoa. Kaivoissa on kuivamuodossa olevia reagensseja. Kun tutkittavaa bakteeria sekoitetaan RapID NH -suspensionesteen kanssa ja syntynyt suspensio laitetaan testialustalle, testikaivot täyttyvät ja niissä tapahtuu kemiallisia reaktioita. Inkubaatioajan jälkeen voidaan testipaneelia tarkastella. Mahdollisten tapahtuneiden kemiallisten reaktioiden seurauksena kaivojen väri muuttuu. Joihinkin testikaivoihin täytyy lisätä reagensseja värimuutoksen aikaansaamiseksi. Värimuutosten perusteella voidaan kaivojen testitulokset merkitä positiiviseksi tai negatiiviseksi. Bakteri voidaan identifioida, kun saatuja testituloksia verrataan tunnettuihin tuloksiin. (Remel 2004c.)

Testin suorittamiseen tarvitaan testipaneelien lisäksi seuraavia reagensseja: RapID Inoculation Fluid -suspensionestettä, RapID Nitrate A -reagenssia, RapID Nitrate B -reagenssia ja RapID Spot Indole -reagenssia. RapID NH System, Spot Indole, Nitrate A ja Nitrate B tulee säilyttää alkuperäispakkauksissaan 2-8°C:ssa. Ennen testin suorittamista pitää reagenssien saavuttaa huoneenlämpö. Testipaneeleja otetaan huoneenlämpöön vain tarvittava määrä, jonka jälkeen ne on käytettävä vuorokauden sisällä. RapID Inoculation Fluid -suspensionestettä säilytetään alkuperäispakkauksessa huoneenlämmössä. (Remel 2004c.)

On kaksi tapaa suorittaa testi. Tunnin kestävää testiä käytetään vain, kun epäillään gonokokin kasvavan selektiivisellä agarilla, ja näyte on peräisin urogenitaalialueelta. Yleistä tapaa käytetään, kun epäillään muita *Neisseriaceae*-bakteereja muilta kehon alueilta ja kun ei ole käytetty selektiivisiä kasvualustoja. Myös *Haemophilus*-lajien ja muiden bakteerien tunnistuksessa käytetään yleistä tapaa. (Remel 2004c.)

Ennen testiä on varmistettava, että bakteeri kasvaa puhtaana. Lisäksi gramvärjäys ja oksidaasitesti on oltava suoritettuina. Viljelymaljaksi suositellaan jotakin seuraavista: suklaamalja, Nutrient Agar -malja, tryptikaasi-soija-agar-malja, jossa voi olla 5 % lampaan verta, Thayer-Martin-malja, Martin-Lewis-malja ja New York City -malja.

Suspensio valmistetaan sekoittamalla bakteeria pumpulitikulla tai silmukalla 1 ml:aan RapID Inoculation Fluid -nestettä siten, että siitä tulee McFarland 3 vahvuinen. Suspensiosta tehdään viljely jälkimaljalle, jotta varmistuttaisiin sen puhtaudesta. Maljaa inkuboidaan 18-24 tuntia 35-37°C:ssa. (Remel 2004c.)

Testipaneeli avataan ja koko suspensio pipetoidaan paneelin oikeaan yläkulmaan. Tämän jälkeen kansi suljetaan ja paneelin etuosa nostetaan 45° kulmaan. Paneelia käännetään tässä asennossa puolelta toiselle ja lopuksi paneelin takaosa nostetaan 45° kulmaan, jolloin testikaivot täyttyvät suspensiolla. Käytettäessä yleistä tapaa paneelia inkuboidaan 35-37°C:ssa neljä tuntia. Gonokokkia epäiltäessä testipaneelia inkuboidaan tunti. Paneeleja inkuboidaan pakkauksen mukana tulevan levyn päällä. Inkuboinnin jälkeen testikaivojen päällä oleva kansi poistetaan, ja reaktiot luetaan vasemmalta oikealle. Testituloksien tulkinnassa käytetään apuna ohjevihkon taulukkoa. Nitrate A sekä Nitrate B -reagensseja lisätään kumpaakin kaksi tippaa kaivoon 9. Kaivoon 10 lisätään kaksi tippaa RapID Spot Indole -reagenssia. Kaivot luetaan minuutin kuluttua. Ensimmäisen kaivon antaessa ainoana positiivisen tuloksen ja jos tutkittava bakteeri on gramnegatiivinen kokki, lisätään Nitrate A ja Nitrate B -reagensseja kumpaakin kaksi tippaa kaivoon 8. Viiden minuutin kuluttua testi luetaan. Paneelin tuloksia vertaamalla tunnettuihin testituloksiin, ja muiden laboratoriotestitulosten perusteella voidaan bakteeri identifioida. (Remel 2004c.)



KUVIO 8. RapID NH System (Remel 2002).

6.5 RapID™ NF Plus System

RapID NF Plus System -testiä (kuvio 9) voidaan käyttää lääketieteellisesti merkittävien glukoosia käyttämättömien gramnegatiivisten bakteerien, mutta myös fermentatiivisten

Enterobacteriaceae-heimoon kuulumattomien bakteerien tunnistuksessa. RapID NF Plus System koostuu testipaneeleista ja niissä olevista reaktiokaivoista, joissa on kuivamuodossa olevia reagensseja. Testiä suoritettaessa kaivojen reagenssit joutuvat kosketuksiin bakteerisuspension kanssa, jolloin kaivoissa tapahtuu kemiallisia reaktioita. Reaktioiden seurauksena kaivojen väri muuttuu. Joihinkin kaivoihin pitää vielä lisätä reagensseja, jotta mahdollinen värireaktio tapahtuisi. Kaivojen värimuutosten perusteella ja tunnettuihin tuloksiin vertaamalla, voidaan bakteeri identifioida. (Remel 2004b.)

Tuotepakkaukseen kuuluu RapID NF Plus -testipaneeleja ja RapID NF Plus -reagenssi. Lisäksi tarvitaan RapID Inoculation Fluid -nestettä, RapID Nitrate A -reagenssia ja RapID Spot Indole -reagenssia. Kaikkia reagensseja RapID Inoculation Fluid -nestettä lukuun ottamatta tulee säilyttää 2-8°C:ssa. (Remel 2004b.)

Ennen testin suorittamista on bakteerille tehtävä gramvärjäys ja oksidaasitesti. Bakteerin on kasvettava viljelymaljalla puhtaana. Viljelyalustaksi suositellaan seuraavia maljoja: tryptikaasi-soija-agar-malja, jossa voi olla 5 % lampaan verta, Nutrient agar, suklaamalja ja MacConcey-malja. Käytettävän bakteerikasvuston tulee olla 18-24 tuntia vanha. Hitaasti kasvavat bakteerit saattavat tarvita kahden vuorokauden kasvatuksen. Silmukkaa tai pumpulitikkua käyttäen siirretään bakteeria viljelymaljalta 1 ml:aan RapID Inoculation Fluid -nestettä, kunnes suspensiosta tulee McFarland 1 vahvuinen. Suspensio täytyy sekoittaa hyvin ja se on käytettävä 15 minuutin kuluessa. Suspensiosta tehdään viljely jälkimaljalle, jotta varmistuttaisiin sen puhtaudesta. Maljaa inkuboidaan 18-24 tuntia 35-37°C:ssa. (Remel 2004b.)

Testipaneeli avataan ja koko suspensio pipetoidaan paneelin oikeaan yläkulmaan. Tämän jälkeen kansi suljetaan ja paneelin etuosa nostetaan 45° kulmaan. Paneelia käännetään tässä asennossa puolelta toiselle ja lopuksi paneelin takaosa nostetaan 45° kulmaan, jolloin testikaivot täyttyvät suspensiolla. Tämän jälkeen paneelia inkuboidaan 35-37°C:ssa neljä tuntia. (Remel 2004b.)

RapID NF Plus -paneeli sisältää kymmenen testikaivoa. Kaivot 4-10 sisältävät kukin kaksi testiä. Nämä kaivot luetaan ennen ja jälkeen reagenssien lisäystä. Aluksi luetaan normaalisti tulokset kaikista kaivoista. Tämän jälkeen kaivoihin 4-8 lisätään kaksi tippaa RapID Plus -reagenssia, kammioon 9 kaksi tippaa RapID Indole -reagenssia ja kaivoon 10 kaksi tippaa RapID Nitrate A -reagenssia. Näiden kaivojen tulokset luetaan 30

sekunnin kuluttua. Tulosten lukemisessa käytetään avuksi tuotepakkauksen ohjevihkoa. Bakteeri voidaan identifioida, kun tulosten avulla saatua koodia verrataan tunnettuihin testituloksiin. (Remel 2004b.)



KUVIO 9. RapID NF Plus System (Remel 2002).

7 VITEK2-LAITE

Vitek2 on täysautomaatti, jolla tehdään bakteerien sekä hiivojen identifikaatio- ja mikrobilääkeherkkyysmäärittämiä. Laite mittaa bakteeri-identifikaation kolorimetrisesti ja antibioottiherkkyudet transmittanssin avulla. Laitteeseen kuuluu ulkoinen tietokone, joka sisältää Advanced Expert System (AES) -tietojärjestelmän (kuvio 10). Se tulkitsee bakteerien identifikaatio- ja antibioottiherkkyystulokset ja on koottu noin 100 000 tieteilisen tutkimustyön ja raportin avulla. Se sisältää noin 20 000 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) -tulosta ja noin 2000 bakteereilla kuvattua resistenssifenotyyppiä. (bioMérieux 2006b: 26-29; bioMérieux 2006a; Miller 2006.)



KUVIO 10. Vitek2-laite ja siihen kuuluva ulkoinen tietokone, jossa tapahtuu tietojenhallinta ja tulosten tulkinta.

Vitek2 on suunniteltu nopeuttamaan tulosten saantia bakteeridiagnostiikassa, lisäämään mikrobiologisten laboratorioden näytteenkäsittelykapasiteettia ja yhtenäistämään työvaiheita. Vitek2-automaatilla testit ovat toistettavampia; eri näytteenkäsittelyvaiheet on standardoitu ja manuaalisesti suoritettavat työvaiheet ovat vähentyneet. Laitevalmistaja pyrkii myös tarjoamaan laajan, kehittyvän bakteeritietokannan, jonka avulla erilaiset mikrobit ja antibioottiresistenssityypit voidaan tunnistaa luotettavasti. Identifikaatio- ja antibioottiherkkyytulokset täytyy saada mahdollisimman nopeasti ja luotettavasti muun muassa jatkuvasti lisääntyvien kliinisesti tärkeiden patogeenien ja niiden nopeasti kehittyvän lääkeresistenssin takia. (bioMérieux 2006b: 26-29; bioMérieux 2006a; Miller 2006.)

Vitek2-laite antaa antibioottitulokset kansainväliseen käyttöön soveltuvina MIC-arvoina ja muuntaa tulokset myös S-I-R-luokituksen (sensitive-intermediate-resistant) mukaisesti. AES-tietojärjestelmä validoi Vitek2-laitteen mittaamat herkkyysarvot tutkitulle organismille sopiviksi sekä antaa tuloksista sanallisen raportin. Laite myös ilmoittaa, ovatko saadut tulokset muun muassa teknisesti mahdollisia. Lisäksi AES antaa CLSI-laboratoriostandardin (Clinical and Laboratory Standards Institute) tuloskommentteja ja tekee terapeutin tulokinnan tietokantaan perustuen (Clinical and Laboratory Standards Institute 2006). (bioMérieux 2006b: 26-29; bioMérieux 2006a; Miller 2006.)

7.1 Identifikaatiomääritys Vitek2-laitteella

Bakteerien identifikaatio Vitek2-laitteella perustuu tietoon bakteereista ja niille tunnusomaisista reaktioista. Tutkittavasta bakteerista tehdään bakteerisuspensio, joka syötetään ID-testikorttiin. Testikortissa on kaikki identifikaatiomäärityksessä tarvittavat reagenssit; niitä ei tarvitse itse lisätä. Tutkittava bakteeri tuottaa testikuopissa muun muassa biokemiallisia entsyymaattisia ja happamuuteen perustuvia reaktioita. Reaktioista syntyvät värituotteet mitataan kolorimetrisesti. Bakteerista voidaan mitata esimerkiksi sen kykyä käyttää hiiltä hyväkseen ja resistenssiä. Vitek2 vertaa saatuja reaktiotuloksia tunnettujen bakteerikantojen tuloksiin ja ilmoittaa todennäköisimmän vaihtoehdon bakteerin tai bakteeriryhmän nimeksi. Testikorteissa on niin sanottuja kontrollikaivoja, joita laite käyttää referenssinä. Laaduntarkkailunäytteiden avulla varmistetaan laitteen antamien tulosten tarkkuus ja oikeellisuus. (bioMérieux 2005b: 1 – 1, 1 – 4.)

Testikorttien ja laitteen tietokannan kehittymisen ansiosta voidaan erottaa paremmin toisilleen sukua olevia lajeja, tietokannassa olevien bakteerien määrä on lisääntynyt, hälytykset tunnistuksen reuna-alueella sijaitsevista bakteereista ovat vähentyneet ja lisätestejä tarkan identifikaation saamiseksi ei tarvitse tehdä enää niin usein. Jatkuva reaktioiden monitorointi takaa nopeamman identifikaation, kuin perinteiset menetelmät, joissa näytteitä kasvatetaan yön yli. Tulokset ovat yleensä valmiina 2-10 tunnissa riippuen tutkittavasta bakteerista ja käytetystä identifikaatiokortista. (Pérez-Vázquez ym. 2000; bioMérieux 2006b: 38.)

7.1.1 Identifikaatiotestikortit

Vitek2-laitteen uudessa GN (Gram-Negative) -testikorteissa on enemmän substraatteja kuin aikaisemmassa ID-GNB (Gram-Negative Identification Card) -testikortissa. GN-testikortti tunnistaa yli 135 organismia ja vanhempi GNB 102. Vitek2 Product Information -ohjekirjassa on lueteltu testikaivoissa tapahtuvat testit sekä kannat, joita Vitek2-laitteen testikortit tunnistavat. (bioMérieux 2005b; Pincus 2006: 8.)

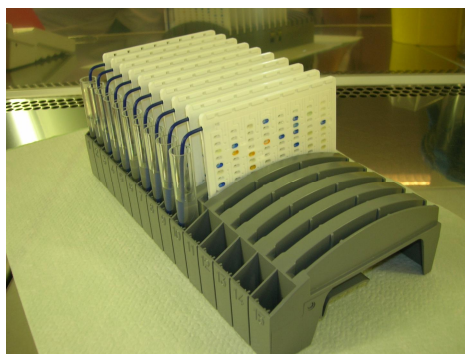
Vitek2-laitteen GN-testikortti sisältää 47 biokemiallista testiä ja yhden kontrollikaivon. Testikortilla voidaan tunnistaa kliinisesti merkityksellisiä fermentoivia tai non-fermentoivia gramnegatiivisia bakteerikantoja. Aallonpituudella 430 nm mitataan reaktiot, joista muodostuva väri vaihtelee värittömästä keltaiseen. Tällä aallonpituudella havaitaan glykosidaasit, fosfataasi, aminopeptidaasit sekä arylamidaasit. Aallonpituudella 660 nm luetaan testit, joissa muodostuva värisävy vaihtelee vaalean sinisestä tummansiniseen. Tällaisia testejä ovat ureaasi, dekarboksylaasi, hapon tai emäksen tuotto, kasvun inhibiitiotesti tietyssä kasvatusaineessa, arylamidaasi ja hiilen hyväksikäyttökyky. Identifikaation saaminen vie keskimäärin kuusi tuntia riippuen tunnistettavasta bakteerista (Miller 2006). (bioMérieux 2006b: 41; bioMérieux 2005b: 1 – 1; Pincus 2006: 8.)

Vitek-laitetta varten on kehitetty uusi bakteerien NH (*Neisseria-Haemophilus*) -identifikaatiokortti. NH-kortin avulla voidaan tunnistaa 26 kliinisesti tärkeintä kasvuolosuhteiltaan vaativaa bakteerilajia. *Haemophilus* ja *Neisseria* -lajien lisäksi se tunnistaa yhden tai useamman lajin jokaisesta *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Gardnerella*, *Kingella*, *Moraxella*, *Oligella* tai *Suttonella* -suvusta. Testikortti sisältää 30 biokemiallista testiä. Tulokset ovat valmiina kuu-

nessa tunnissa. (bioMérieux 2005b: 4 – 1; bioMérieux 2006c: 1, 7; Vuento – Kujala 2003: 204.)

7.1.2 Testikorttien inokulaatio, sulkeminen ja inkubaatio

Tutkittavasta bakteerista valmistettu bakteerisuspensioputki laitetaan näytekasettiin ja identifikaatiokortti sen viereen (kuvio 11). Identifikaatiokortin siirtoputki (transfer tube) asetetaan bakteerisuspensioon. Vitek2-laitteen yhteen näytekasettiin mahtuu viisitoista testikorttia. Potilastiedot ja testikorttien tiedot syötetään ulkoisen Smart Carrier - työaseman avulla näytekasetin muistiin (Miller 2006). Täytetty näytekasetti asetetaan Vitek2-laitteen niin kutsuttuun risteilijään. Laitteessa oleva viivakoodinlukija lukee muistikortille tallennetut tiedot ja korteissa olevat viivakoodit. Näytekasetti siirtyy automaattisesti laitteen pipetointiasemaan, jossa Vitek2 tekee itsenäisesti mahdolliset antibioottiherkkyyslaimennokset. Sitten näytekasetti siirtyy edelleen vakuumikammioon, jossa alipaineen avulla bakteerisuspensio pakotetaan siirtoputken kautta testikortin pieniin kanaviin ja niiden kautta testikaivoihin. Tätä testikorttien täyttöä kutsutaan inokulaatioksi. (Pincus 2006: 4; bioMérieux 2005a: 2 – 2.)



KUVIO 11. Testikortit ja bakteerisuspensioputket asetetaan näytekasettiin.

Vitek2 siirtää automaattisesti kortit, joiden testikaivot on täytetty bakteerisuspensiolla karuselli-inkubaattoriin. Sitä ennen laite katkaisee siirtoputken ja sinetöi kortin. Karuselli-inkubaattoriin mahtuu kuusikymmentä testikorttia. Kaikkia korttityyppejä inkuboidaan $35,5 \pm 1,0$ celsiusasteessa. Viidentoista minuutin välein jokainen kortti siirretään inkubaattorista laitteen optiseen asemaan reaktionlukua varten ja sieltä taas takaisin inkubaattoriin. (Pincus 2006: 4 - 5.)

7.1.3 Identifikaation kolorimetrinen mittaus

Vitek2-laitteessa on kaksi optista yksikköä, joissa molemmissa on kahdeksan valoa emittoivaa diodia (LEDiä). Lisäksi laitteessa on yksi valoa vastaanottava yksikkö. Laite lukee reaktioita kolmella eri aallonpituudella. Optinen yksikkö TX1 lukee 660 nm:n ja TX3 430-568 nm:n aallonpituuksia. Kolorimetriaa mitataan aallonpituuksilla 430-568 nm ja 660 nm. Antibioottiherkkyyttä mitataan aallonpituudella 660 nm. (bioMérieux 2004c: 3-21; bioMérieux 2006b: 39.)

Laite mittaa testireaktiot käyttämällä useaa eri näkyvän valon alueen aallonpituutta. Eri aallonpituuksilla saadaan mitattua reaktioista syntyvät erilaiset värituotteet, koska värit absorboivat itselleen ominaista aallonpituutta. Absorption ansiosta kyseisen valon läpäisevyys eli transmittanssi pienenee, jolloin voidaan päätellä, että näyte on tietyn väristä. Mitä suurempi substraattien metaboloimisesta syntyneiden värillisten tuotteiden voimakkuus eli intensiteetti on, sitä enemmän valoa absorboituu näytteeseen. Optimaalisen ajan saavutettuaan laite mittaa jokaisen testikaivon viidentoista minuutin välein, yhteensä noin 16 kertaa (Pincus 2006: 6). Kone käy läpi viisi vaihetta lopullisen identifikaation saamiseksi. Niin sanotun nollavaiheen algoritmin eli Data Quality Check -vaiheen aikana laite arvioi, onko kortti täytetty ja onko testikaivoihin jäänyt ilmakuplia. Silloin laite käy läpi jokaisen kaivon erikseen ja vertaa niiden saamia arvoja tyhjiille kaivoille tyypillisiin kynnysarvoihin. (bioMérieux 2006b: 47-51; Penttilä 2004: 66-67.)

Ensimmäisen vaiheen algoritmista eli Reaction Evaluation -vaiheessa Vitek2 arvioi testikaivoissa tapahtuneet reaktiot kineettisellä analyysillä ja antaa työstämättömät arvot (RTU eli raw transmittance units) jokaiselle testille. Laitteeseen on syötetty kynnysarvo, jonka ylittyttyä testituloksen voi tulkita positiiviseksi. Testireaktiot tulkitaan yksittäin positiivisiksi tai negatiivisiksi. Heikot, liian lähellä kynnysarvoa olevat reaktiot ilmoitetaan kysymysmerkillä. (bioMérieux 2006b: 52, 53; Pincus 2006: 6.)

Toisen vaiheen algoritmiin kuuluu Comparison Step, Aggregation Step ja Decision Step. Silloin Vitek2-laitteen AES-tietojärjestelmä vertaa saatuja reaktiotuloksia tunnettujen bakteerikantojen tuloksiin ja ilmoittaa todennäköisimmän vaihtoehdon bakteerin tai bakteeriryhmän nimeksi. Vertailukohteena toimii suuri määrä bakteerikantoja, jotka on testattu monenlaisissa kasvatusolosuhteissa. Kannat on kerätty klinikoiden, yliopistojen ja teollisuuden bakteerikokoelmista sekä yleisistä American Type Culture Collection

(ATCC) -kokoelmista (ATCC The Global Bioresource Center 2006). (bioMérieux 2006b: 50, 53; Pincus 2006: 6; Miller 2006.)

Laite ilmoittaa bakteeri-identifikaation luotettavuuden sekä sanallisesti, että prosentuaalisesti. Täydellinen reaktiotulosten yhtäpitävyys tunnettuihin reaktiotuloksiin ilmoitetaan todennäköisyydellä 99 %. Bakteeri voidaan nimetä luotettavasti, jos prosenttiarvo on 85-99. Vitek2 antaa listan mahdollisista bakteereista, ehdottaa lisätestejä tai ilmoittaa, ettei identifikaatio onnistu mikäli tarpeeksi yhtenevää tulossarjaa ei saada tai jos joitakin bakteereja ei voida erottaa toisistaan lajitasolle luotettavasti. Bakteerien tunnistusluokkia ovat excellent (96-99 %), very good (93-95 %), good (89-92 %), acceptable (85-88 %), low discrimination ja unidentified. Toiseksi viimeisessä luokassa laite löytää kaksi tai kolme nimeämisvaihtoehtoa tunnistettavalle bakteerille. Niiden yhteenlaskettu prosenttiluku on 100 %. Tällöin Vitek2 saattaa ehdottaa tarkan identifikaation saamiseksi manuaalisesti tehtäviä lisätestejä, kuten DNAasi, indoli tai liikkuvuus. Jotkut näistä lisätesteistä sisältävät myös testikorttiin. Niitä suositellaan kuitenkin tehtäviksi, koska niistä saatavat tulokset poikkeavat joskus laitteen antamista tuloksista. (bioMérieux 2006b: 54; bioMérieux 2005b: 1 – 4, 1 – 6, 1 – 7.)

Viimeisessä tunnistusluokassa laitteella on joko yli kolme nimeämisvaihtoehtoa tutkitavalle näytteelle tai ei yhtään. Silloin bakteeri voitaisiin nimetä sen tuottaman reaktiosarjan mukaan yli kolmella eri tavalla tai sitten kyseessä on niin harvinainen reaktiosarja, ettei bakteeria voi nimetä ollenkaan. Kaikki reaktiot voivat olla myös kokonaan negatiivisia tai liian lähellä kynnyksrajaa, jolloin laite ilmoittaa, että kyseessä on niin sanottu ”non-reactive biopattern”. Näytteen puhtaus, gramvärjäys ja elinkelpoisuus kannattaa varmuuden vuoksi tarkistaa tilanteissa, jolloin identifikaatio ei onnistu. Näyte täytyy tunnistaa muilla referenssimenetelmillä, jos lisätestit eivät riitä identifikaation varmistamiseksi. Tulosten tulkinnassa kannattaa muistaa, että bakteerin nimen tulee täsmätä sen antibioottiherkkyyden kanssa. (bioMérieux 2006b: 54; bioMérieux 2005b: 1 – 6; Pincus 2006: 8.)

7.2 Antibioottiherkkyyismääritys Vitek2-laitteella

Vitek2-laite on FDA (Food and Drug Administration) -järjestön hyväksymä menetelmä antibioottien MIC-arvojen määrittämiselle (U.S. Food and Drug Administration 2006; Miller 2006). Laitteen tekemä antibioottiherkkyyismääritys perustuu minimum inhibito-

ry concentration (MIC) -arvon eli pienimmän bakteerin kasvun estävän antibioottikon-sentraation määrittämiseen. Vitek2 tarkkailee testattavan bakteerin kasvua sekä antibi-ootin läsnäollessa että ilman. Inkubaatioajan päätteeksi laite mittaa MIC-arvon jokaisel-le kortin antibiootille. Lisäksi laite ottaa huomioon lukuisia eri tekijöitä, jotka saattavat vaikuttaa oikean tuloksen saamiseen. Bakteerin oikea identifiointi on oleellinen antibi-oottiherkkyystulosten oikeassa tulkinnassa. Herkkyysmäärittelyn kontrollina toimivat ATCC-bakteerikannat, joiden herkkyysarvot tunnetaan etukäteen. (bioMérieux 2005b: 8 – 3, 8 – 4, 8 – 7.)

7.2.1 Antibioottiherkkyyskortit

Vitek2-laitetta varten on kehitetty eri antibiootteja sisältäviä lääkeherkkyyskortteja eri-tyyppisiä bakteereja varten. Käytämme opinnäytetyössämme kahta eri antibioottiherk-kyyskorttia AST-N041 ja AST-N029. Ne sisältävät antibiootteja, joita tarvitaan tutki-miemme gramnegatiivisten bakteerien herkkyysmäärittelyssä. Jokaisessa Vitek2:n anti-bioottiherkkyyskortissa on 64 kaivoa. Yksi kaivoista sisältää ainoastaan elatusainetta, ja se toimii referenssinä. Muissa kaivoissa on kutakin spesifistä antibioottia 2-6 erilaisena konsentraationa yhdistettynä elatusaineeseen (Miller 2006). (bioMérieux 2005b: 8 – 3.)

Uusi AST-N041-antibioottiherkkyysmäärittelykortti on tarkoitettu *E. coli*, *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* ESBL-kantojen tutkimiseen. Antibioottiherkkyyskortin erillisellä ESBL-varmistustestillä tutkitaan antibiootin ja klavulaanihapon yhteisvaikutusta klassisilla ESBL-kannoilla. Testi sopii vain niiden ESBL-kantojen tunnistamiseen, jotka ovat CLSI-laboratoriostandardissa luokiteltu mahdollisiksi ESBL-kannoiksi ja jotka inhiboi-tuvat klavulaanihapolla (bioMérieux 2005 b: 8 – 2). ESBL-varmistustesti koostuu kefo-taksiimista, keftatsidiimista ja kefepiimista sekä klavulaanihapon kanssa että ilman. Laite ilmoittaa ESBL-varmistustestin tuloksen erillisenä, joko positiivisena tai negatii-visena tuloksena. Testikortti sisältää ESBL-varmistustestissä käytettävien antibioottien lisäksi myös muita antibiootteja, joten sitä voidaan käyttää muidenkin antibioottiherk-kyysien tutkimiseen. Laite ei päätele pelkästään erillisen ESBL-testin perusteella, on-ko kyseessä ESBL-kanta. AES-tietojärjestelmä voi tunnistaa fenotyyppimäärittelyn avulla ESBL-fenotyypin myös muiden antibioottitulosten perusteella. (Miller 2006; bioMérieux 2005c: 1 – 2, 6.)

AST-N029-antibioottiherkkyyškortti on tarkoitettu gramnegatiivisten sauva**bakteerien** antibioottiherkkyyksien mittaamiseen. Testikortti sisältää erityisesti pohjoismaissa potilaiden hoitoon käytettäviä antibiootteja. Testikortti voi myös ilmoittaa tutkittavan kannan ESBL-ominaisuudesta kaikkien antibioottitulosten perusteella. Erillistä klavulaanihappotestii AST-N029-herkkyyškortti ei sisällä. (Miller 2006.)

7.2.2 Antibioottiherkkyyden mitta**us**

Vitek2-laite määrittää bakteerien antibioottiherkkyyden valon läpäisevyyden eli transmittanssin avulla. Siinä bakteerikasvun kehitystä seurataan sen perusteella, kuinka hyvin valo läpäisee bakteerisuspension aallonpituudella 660 nm. Kun valo kohdistetaan näytesuspensioon, jossa on liukenemattomia partikkeleita, valo osittain siroaa tai heijastuu suspensiosta tai absorboituu siihen. Näytteen läpäisseen valon voimakkuuteen vaikuttavat muun muassa yhdisteen pitoisuus (bakteerimäärä) tai partikkelikoko. Näytteen transmittanssi saadaan laskettua kaavalla $T = I_s / I_0$, jossa I_s = näyteliuoksen läpäisseen valon voimakkuus ja I_0 = näytteeseen osuvan valon voimakkuus. (Penttilä 2004: 67, 71-72; bioMérieux 2006b: 2.)

Transmittanssimittauksesta saatua arvoa verrataan kontrollikaivosta saatuihin arvoihin. Kontrollikaivossa bakteeri kasvaa vapaasti, ilman antibioottien estävää vaikutusta. Mitatun transmittanssin avulla voidaan edelleen laskea näytteeseen absorboituneen eli imeytyneen valon määrä. Absorboituneen valon määrä on kääntäen verrannollinen näytteen läpäisseen valon logaritmiin eli $A = -\log T$. Silloin kun bakteeri on tietylle antibiootille herkkä, se joko kuolee tai ei pysty kasvamaan eikä lisääntymään suspensiossa. Sen ansiosta valo pääsee helposti suspension läpi ja näytteeseen absorboitunut valomäärä on pienempi kuin, jos bakteeri olisi resistentti antibiootille ja pystyisi lisääntymään suspensiossa. Laite suorittaa bakteerikasvun analysoinnin kineettisesti viidentoista minuutin välein. Absorbanssia siis seurataan ajan funktiona (Jaarinen-Niiranen 2000: 59). (Penttilä 2004: 67, 71-72; bioMérieux 2006b: 2.)

7.2.3 Antibioottiherkkyysmäärityksen vaiheet

Vitek2 tarkistaa ensiksi näytekaivojen täytön onnistumisen muun muassa ilmakuplien varalta. Kontrollikaivosta saatavan alkumittausarvon tulee olla hyväksytyissä rajoissa, jotta transmittanssin määrittäminen olisi mahdollista. Laite eliminoi poikkeavat mittausarvot, jotka saattavat olla seurausta esimerkiksi ulkoisista häiriöistä tai siitä, että bakteerisuspensio ei ole ollut tarpeeksi homogeeninen (Miller 2006). (bioMérieux 2006b: 3-5.)

Vitek2 muodostaa bakteerikasvusta mittauskäyrän, jossa bakteerin määrä on kuvattu ajan suhteen. Laite analysoi mittauskäyrää usealla eri tavalla, jotta bakteerikasvu ja siinä tapahtuvat muutokset havaittaisiin paremmin. Havainnoitavia asioita muodostetussa kuvaajassa ovat esimerkiksi suurin kulmakerroin, suurin muutos bakteerikasvussa prosentteina tietyn ajan kuluessa, kuvaajan alapuolelle jäävän alueen koko sekä suurin muutos sen koossa. (bioMérieux 2006b: 6-7.)

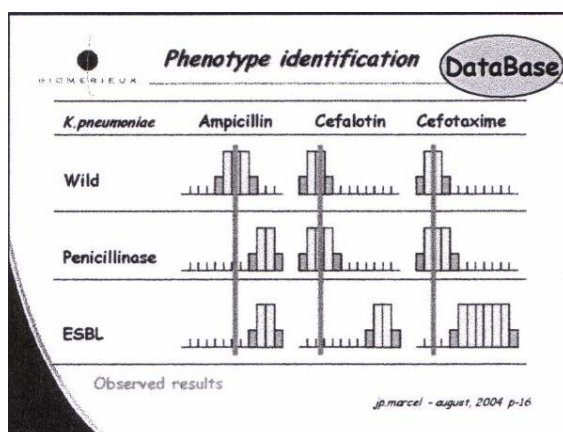
Vitek2 määrittää bakteerin kasvunopeuden kontrollikaivossa tapahtuvan bakteerimäärän muuttumisen mukaan ja jakaa bakteerit hitaasti tai nopeasti kasvaviin kantoihin. Tämän jaon avulla valitaan sopiva ajankohta antibioottikaivojen analysoinnille. Vitek2 voi kuitenkin vielä muuttaa näytteen inkubointiaikaa tarpeen mukaan. Inkubaatioajan muuttamisen ja MIC-arvojen eriaikaisen lukemisen ansiosta saadaan nopeat tulokset nopeasti kasvaville bakteereille, havaitaan hidastunut bakteerikasvu antibioottikaivossa hidastamatta muiden MIC-arvojen laskua, resistentit kannat tunnistetaan nopeasti, ja havaitaan niin sanottu matala-arvoinen resistenssi. Inkubaatioajan valitseminen tapahtuu standardianalyysi, kasvuviihveaika-analyysi, nopea resistenssianalyysi ja complex growth analysis -vaiheiden perusteella. (bioMérieux 2006b: 8-10, 16.)

Standardi ja kasvuviihveaika -analyyseissä havaitaan antibiootin läsnäolon takia aiheutuva bakteerikasvun viivästyminen. Inkubaatioaikaa voidaan analyysin perusteella pidentää. Sääntönä on, että jos kontrollikaivossa havaitaan bakteerikasvua jo 330 minuutin sisällä, näytteen inkubaatiota pidennetään viidellä luvuvaiheella. Silloin antibioottia sisältävissä kaivoissa mahdollisesti viivästynyt kasvu varmasti havaitaan. Inkubaatioajan pidennys ja luvuvaiheiden lisääminen ovat usein antibioottikohtaisia. (bioMérieux 2006b: 11-12.)

Nopean resistenssimäärityksen avulla hyvin resistentit kannat havaitaan nopeasti. Se perustuu siihen, että Vitek2 ilmoittaa MIC-arvon heti kun bakteerikasvu on havaittu kaikkein suurimmassa antibioottipitoisuudessa. Laite myös huomauttaa, jos suurissa antibioottipitoisuuksissa ilmenee bakteerikasvua vasta normaalin inkubointiajan jälkeen (Complex growth analysis). Tällä käytännöllä estetään väärin tulosten saaminen bakteerien kasvun häiriinnyttyä antibiootin läsnäolon vuoksi. Inkubaatioaika kestää niin pitkään kuin on tarpeellista, mutta kuitenkin enintään 18 tuntia. MIC-arvo määritetään heti kun se on mahdollista. (bioMérieux 2006b: 13-15.)

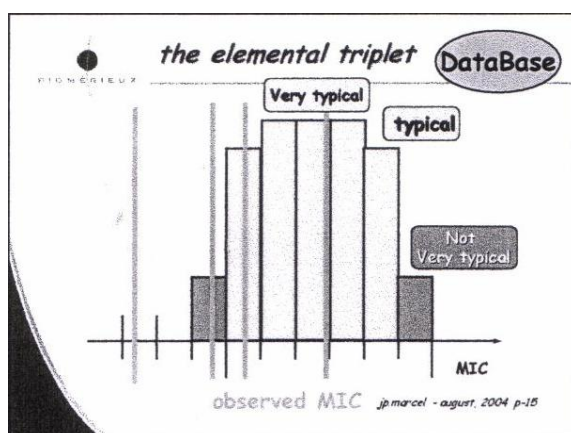
Eri MIC-luokkiin kuuluvien bakteerien kasvukäyrä voidaan määrittää käyttämällä testi-kaivoissa 2-6 tarkoituksenmukaisesti valittua antibioottikonsentraatiota. Jokainen testi-kaivo luetaan kolme kertaa 16:sta eri asennosta. Vitek2 piirtää kolmiulotteisen kuvaajan, jossa eri akseleille on merkitty näytteen saamat transmittanssiarvot saman antibiootin eri konsentraatioille. Vitek2 vertaa havaittujen transmittanssiarvojen perusteella piirrettyä kuvaajaa aiemmin tutkittujen, eri MIC-arvoisten kantojen antamiin kuvaajiin. Tulokseksi annetaan kolmiulotteisen matemaattisen mallin avulla tutkittavaa näytettä eniten vastaava MIC-arvo. Laite jakaa antibiootikohtaiset tulokset eri S-I-R -luokkiin CLSI-standardin mukaisesti. Bakteerikannat Vitek2-laitteen tietokantaa varten on valittu maailmanlaajuisesti edustamaan eri bakteerilajeja ja resistenssimekanismeja. (bioMérieux 2006b: 18-22. Miller 2006. Marcel 2004: 1.)

Vitek2-laite mittaa bakteerin antibioottiherkkyydet ja tulkitsee bakteerin S-I-R-luokituksen mukaisesti herkäksi tai resistentiksi eri antibiooteille. Antibioottien MIC-arvoja ei kuitenkaan pidä analysoida yksittäin vaan pitää miettiä, millainen vaikutus samaan antibioottiperheeseen kuuluvilla antibiooteilla on ihmisen elimistössä. (Goesens 2004: 1-2.) Vitek2 vertaa tutkittavaa kantaa niihin saman lajin kantoihin, joilla on normaali antibioottiherkkyys. Vertailtavien MIC-arvojen perusteella laite tulkitsee, onko tutkittavalla bakteerikannalla jokin antibioottiresistenssimekanismi. Vitek2-laitteen tietokannassa on kuvattu saman bakteerilajin eri resistenssimekanismit, joihin se vertaa antibioottituloksia määrittäessään tutkittavalle kannalle oikean fenotyypin. Tällaisia fenotyyppisiä ovat esimerkiksi ”villityyppi” eli bakteerikanta, jolla ei ole luonnollisesta poikkeavia resistenssimekanismeja sekä ESBL-kanta, joka on resistentti betalaktaameja kohtaan. Eri antibioottiresistenssifenotyyppien antamista MIC-arvoista on piirretty histogrammeja AES-tietojärjestelmään (kuvio 12). (Marcel 2004: 3; Miller 2006.)



KUVIO 12. Tutkitun *K. pneumoniae* -kannan MIC-arvojen sijoittuminen AES-tietojärjestelmän eri resistenssifenotyyppeihin (Marcel 2004: 16).

Histogrammin leveimpään kohtaan sijoittuu suurin osa kyseisen fenotyypin yksilöistä (kuvio 13). Kapeimpaan kohtaan sijoittuvat ne tapaukset, jotka eivät ole niin tyypillisiä kyseisen resistenssimekanismin omaavalle bakteerille. Histogrammin muoto ja sijoittuminen antibioottien MIC-asteikkoon vaihtelevat mekanismin mukaan. Vitek2 määrittää tutkittavan kannan fenotyypin vertailemalla jokaisesta antibiootista saatuja MIC-tuloksia tietokannassa oleviin MIC-tuloksiin. Laite arvioi, mikä fenotyyppi on lähin bakteerin saamille tuloksille. (Marcel 2004: 3; Miller 2006.)



KUVIO 13. Saadun antibioottiherkkyysarvon sijoittuminen yhden resistenssifenotyypin MIC-asteikkoon (Marcel 2004: 16).

Vitek2-laitteen Advanced Expert System (AES) -tietojärjestelmä osaa ilmoittaa, mille muille antibiooteille kyseisen fenotyypin omaava bakteerikanta on tavallisesti resistentti. AES-tietojärjestelmä voi sen perusteella ehdottaa joidenkin antibioottien herkkyystuloksiin korjausta. Esimerkiksi Vitek2 voi mitata, että *Escherichia coli* -lajiksi tunnistettu kanta on resistentti kolmannen polven kefalosporiineja kohtaan. Tulosten perusteella laite tulkitsee, että kyseessä on resistenssimekanismltaan laajakirjainen betalaktaamasintuottaja eli ESBL-kanta. Siten kyseinen kanta on CLSI:n mukaan in vivo resistentti kaikkia betalaktaameja kohtaan. Käyttäjän päätöksellä myös nämä antibioottitulokset voidaan muuttaa resistenteiksi. (Miller 2006; Goessens 2004: 1-2.)

Testikortteihin valitut antibiootit osoittavat herkimmin eri antibioottiresistenssimekanismit. Esimerkiksi pneumokokin oksasilliiniresistenssi osoittaa todennäköisen herkkyyden alentumisen penisilliinejä kohtaan. Resistenssimekanismien tunnistamisessa on vaikeata se, että eri mekanismit voivat ilmetä samanlaisina fenotyyppeinä. Toisaalta samalla bakteerilla voi olla yhtäaikaaisesti useita eri resistenssimekanismeja. Laite ei tunnista itse uusia resistenssityyppejä, mutta se ilmoittaa poikkeavista tuloksista. (Goesens 2004: 1-3; Miller 2006.)

7.3 Identifikaatio- ja antibioottil herkkyysmääritysten suoritus Vitek2-laitteella

Tutkittava bakteeri täytyy ensiksi gramvärjätä sillä testikortin valinta riippuu siitä, onko bakteeri grampositiivinen vai -negatiivinen. Vitek2 Product information -ohjekirjassa on kerrottu tarvittavat näytteen viljelyvaatimukset. Näytteen tulee olla viljelty oikealle kasvualustalle ja inkuboitu asianmukaisissa olosuhteissa. Näytteen suositeltu ikä vaihtelee sen mukaan, mitä bakteeria tutkitaan ja määritetäänkö bakteerille lääkeherkkyys vai identifikaatio. Suositeltavaa olisi, että bakteerikannat olisivat alle vuorokauden vanhoja (bioMérieux 2005b: 1-24; 4-20). Ohje kertoo myös, kuinka vahva näytteestä tehty bakteerisuspensio saa olla käytettäessä eri testikortteja. Bakteerin tulee olla puhtaaksi viljelty oikeiden tulosten varmistamiseksi. (bioMérieux 2005b: 1 – 24, 2 – 20, 4 – 20, 8 – 6, 8 – 19.)

Testikorttien pitää olla huoneenlämpöisiä ennen määrittystä. Steriiliä 0,45 % natriumkloridiliuosta (pH 5,0-7,2) siirretään 3 ml puhtaaseen polystyreeniputkeen (Miller 2006). Natriumkloridia käytetään liuottamaan kaivoissa olevat reagenssit ja antimikrobiologiset aineet. Maljalta valitaan puhtaita bakteeripesäkkeitä, jotka siirretään esimerkiksi steriilillä viljelysauvalla muoviputkeen siten, että bakteerisuspensiosta tulee McFarland standardin mukainen useimmiten 0,5-0,63; NH-kortissa 2,70-3,30. Bakteerisuspension vahvuus tarkastetaan Vitek2 Densichek -laitteella (kuvio 14). Testikortin toiminta ei ole yhtä luotettava, jos



KUVIO 14. Vitek2 Densichek -laite.

suspension vahvuus ei ole määritetyllä alueella. Suspension ikä ennen laitteeseen syöttämistä saa vaihdella määrittäyksestä riippuen puolesta tunnista tuntiin. Identifikaatiomäärittäyksessä suspension tulee olla ≤30 min ja herkkyysmäärittäyksessä ≤60 min vanha

(bioMérieux 2005b). Laite laimentaa valmistetun bakteerisuspension edelleen tarvittavan vahvuiseksi herkkyysmäärittystä varten. Laitteeseen tarvitsee vain syöttää bakteerisuspensioputki, ID-kortti, herkkyyskortti ja puhdas putki laimennosta varten. Suspension voi tarvittaessa laimentaa myös itse. Vitek2 täyttää kortin, sulkee sen ja kuljettaa inkubaattoriin/näytelukijaan automaattisesti. (bioMérieux 2005b: 8 – 3, 8 – 4; bioMérieux 2005a: 2 – 2.)

8 AIKAISEMMAAT TUTKIMUKSET

Löysimme useita tutkimuksia koskien Vitek2-laitetta ja sen kykyä tunnistaa *Enterobacteriaceae*-kantoja. Myös ESBL-testin toimivuutta on tutkittu paljon. Sen sijaan nonfermentatiivisten ja kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerien identifikaatiota Vitek2-laitteella on tutkittu vähemmän. Useimmissa tutkimuksissa verrataan Vitek2-laitteen ja perinteisten identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmäärittämenetelmien antamia tuloksia. Myös Vitek2-laitetta ja muita bakteeridiagnostiikassa käytettäviä laitteita on vertailtu toisiinsa.

Turun yliopistollisen keskussairaalan laboratorio (TYKSLAB) teki vuonna 2006 tutkimuksen ”Comparison of workflow and accuracy of identification and antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and enterococci by Vitek 2 and routine methods”. Tutkimuksessa vertailtiin Vitek2-laitteen ja perinteisten menetelmien identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmäärittäskykyä *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* ja enterokokki -kannoilla. Lisäksi tutkittiin kuinka paljon Vitek2-laitteen käyttö säästää aikaa verrattuna rutiinimenetelmiin. Tutkimuksessa käytettyihin perinteisiin identifikaatiomenetelmiin kuului muun muassa Api20E-paneeli. Perinteisenä menetelmänä antibioottiherkkyysmäärittäyksissä käytettiin antibioottikiekkoherkkyystestiä. Vitek2-laitteella käytettiin identifikaatiomäärittäyksissä GNB-korttia ja antibioottiherkkyysmäärittäyksissä AST-N029-korttia gramnegatiivisille sauvabakteereille ja AST-P524-korttia enterokokeille. Näytteitä oli yhteensä 353. *Enterobacteriaceae*-kantoja oli 327, gramnegatiivisia oksidaasipositiivisia sauvabakteereja 13 ja enterokokki-kantoja 21. (Rantakokko-Jalava ym. 2006: 43-45.)

Vitek2 tunnisti oikein 322 (94,7 %) 340 gramnegatiivisesta kannasta ja 17 (81 %) 21 *Enterococcus faecalis*-kannasta. Tunnistattaessa *Enterobacteriaceae*-kantoja, identifikaatioerot menetelmien välillä tarkistettiin tekemällä testit uudestaan sekä Vitek2:lla ja Api20E:lla. Tarvittaessa myös joitain lisätestejä käytettiin. Enterokokkien kohdalla tehtiin testit Vitek2:lla ja Api20STREP:lla. Lopullinen varmistus bakteerista saatiin 16S rDNA-geenisekventaatiolla. Identifikaatioluokituksessa erotusaste 174 (51,2 %) kannan kohdalla oli erinomainen, 120 (35,3 %) kannalla erittäin hyvä, 24 (7,1 %) kannalla hyvä ja neljällä (1,2 %) hyväksyttävä. 21 *Enterococcus faecalis* -kannasta Vitek2 tunnisti 17 (81 %). Vitek2-laitteella gramnegatiivisten bakteerien identifikaatio kesti kolme tuntia ja enterokokkien identifikaatio kaksi tuntia 45 minuuttia. (Rantakokko-Jalava ym. 2006: 46-47.)

Mikrobilääkeherkkyystesteissä saatiin yhteensä 4248 paria tuloksia verrattaessa Vitek2-laitetta ja diffuusiokiekkomenetelmää. Näistä 4068 eli 95,5 % oli yhteneviä. Herkkyysmääritys tehtiin S-I-R-luokituksen mukaisesti. Eniten tuloseroja menetelmien välillä oli keftatsidiimi- ja kefalotiiniherkkyystesteissä. MIC-arvo tarkistettiin, jos menetelmien antamien tulosten välillä oli S-R-eroja. *Enterobacteriaceae*-kantojen antibioottiherkkyystesti Vitek2-laitteella kesti keskimäärin kuusi tuntia 35 minuuttia, enterokokkien kymmenen tuntia kahdeksan minuuttia ja oksidaasipositiivisten sauvabakteerien 11 tuntia 20 minuuttia. Tutkimuksen johtopäätös oli, että Vitek2 tunnistaa erinomaisesti *Enterobacteriaceae*-kantoja, ja niille annetut antibioottiherkkyystulokset ovat luotettavia. Vitek2 säästi myös aikaa, sillä tutkimuksen mukaan lopulliset bakteerien identifikaatio- ja herkkyystulokset olivat 70 prosentilla tutkituista kannoista valmiina vähintään 16 tuntia rutiinimenetelmiä aikaisemmin. Lisäksi laskettiin, että 22 näytteellä Vitek2 säästi aikaa noin 80 minuuttia per päivä verrattuna rutiinimenetelmiin. Yli 80 % aamulla laitteeseen laitetuista *Enterobacteriaceae*-kannoista oli valmiina samana päivänä ennen kello 16:00. (Rantakokko-Jalava ym. 2006: 47-49.)

Spanu ym. selvittivät vuonna 2006 Vitek2-laitteen toimivuutta *Enterobacteriaceae*-kantojen ESBL-tunnistuksessa tutkimuksessaan ”Evaluation of the New VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for Rapid Detection of ESBL Production in *Enterobacteriaceae* Isolates”. Tutkimuksessa käytettiin 1129 kliinisesti tärkeää *Enterobacteriaceae*-löydöstä. Kaikille kannoille, paitsi ampisilliiniherkille *E. coli*, *P. mirabilis* ja *S. enterica* -kannoille tehtiin isoelektrinen määrittäminen (IEF) betalaktamaasien osalta. Samoilta kannoilta määritettiin PCR:n (polymerase chain reaction) avulla ESBL-

geenejä. Niiltä kannoilta, joilla oli ESBL-geenejä, määritettiin MIC-arvot kefotaksiimille, keftatsidiimille ja kefepiimille sekä erikseen että yhdessä klavulaanihapon kanssa. Lisäksi kaikille ESBL-positiivisille *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ja *P. mirabilis* -lajeille tehtiin ESBL-kiekkotesti, jolla tutkittiin herkkyys kefotaksiimille ja keftatsidiimille sekä erikseen että klavulaanihapon kanssa. Lopullinen tulos oli molekulaarinen tulos, jota vahvisti IEF- ja betalaktamaasiherkkyystulos. Näitä tuloksia taas verrattiin Vitek2-laitteen ESBL-testin antamiin tuloksiin. (Spanu ym. 2006: 3257-3258.)

Vitek2-laitteen testikorttina käytettiin N045-korttia, joka sisälsi ESBL-testin. Kortissa oli kuusi kaivoa, jotka sisälsivät kefepiimin, kefotaksiimin ja keftatsidiimin sekä erikseen että klavulaanihapon kanssa. Vitek2-laitteen antamia tuloksia verrattiin molekulaarisen testin tuloksiin. Molekulaarisella testillä saatiin selville, että 312 kannalla oli ESBL-geeni. Useimmat kuuluivat *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* ja *P. mirabilis* -lajeihin, mutta niistä 61 ei CLSI:n mukaan luokitella ESBL-lajeiksi. Kaikki *E. coli*, *Klebsiella* ja *P. mirabilis* -lajit, joilla oli ESBL-geenejä, täyttivät CLSI:n ESBL-kriteerit ESBL-kiekkotestissä. (Spanu ym. 2006: 3258.)

Vitek2 suoriutui erinomaisesti *Enterobacteriaceae*-kantojen ESBL-tunnistuksesta, kun tuloksia vertailtiin molekulaarisen testin tulosten kanssa. Vitek2-laite tunnisti oikein 306 kantaa 312 ESBL-kannasta. Kahdelle kannalle 817 ESBL-negatiivisesta kannasta Vitek2 antoi väärän positiivisen tuloksen. Tutkimus sisälsi myös kaksi *K. oxytoca*-kantaa, jotka olivat K1-tuottajia. Nämä Vitek2 tunnisti oikein ESBL-negatiivisiksi. Tutkimuksessa Vitek2-laitteen sensitiivisyys oli 98,1 % ja spesifisyys 99,7 %. Aikaa määrittäykseen kului 6-13 tuntia. Keskimääräinen aika oli 7,5 tuntia. Tutkimuksen perusteella Vitek2-laitteen arvioitiin olevan nopea ja luotettava väline rutiinidiagnostiikan ESBL-tunnistuksessa. (Spanu ym. 2006: 3258-3261.)

Ferraro ym. selvittivät vuonna 2004 Vitek2-laitteen ESBL-testin toimivuutta tutkimuksessaan ”Clinical Evaluation of an ESBL Confirmation Test for Use with the VITEK 2[®] System”. ESBL-testiin kuului kuusi testikaivoa, jotka sisälsivät kefotaksiimin, keftatsidiimin ja kefepiimin sekä erikseen että yhdessä klavulaanihapon kanssa. ESBL-testiä verrattiin NCCLS:n (nykyinen CLSI) ohjeistuksen mukaisesti suoritettuun ESBL-kiekkotestiin, jolla tutkittiin herkkyys kefotaksiimille ja keftatsidiimille sekä erikseen että klavulaanihapon kanssa. Tutkimus suoritettiin kolmessa laboratorioissa ja käytettäviä bakteerikantoja oli yhteensä 318. Bakteerikantoihin kuului sekä uusia että pakastet-

tuja *E. coli*, *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* -kantoja. Jokaisen laboratorion tutkimiin bakteerikantoihin kuului vähintään 50 ESBL-positiivista ja 50 ESBL-negatiivista kantaa. Lisäksi yksi laboratorio tutki 29 vaikeasti tunnistettavaa ESBL-positiivista *E. coli* ja *K. pneumoniae* -kantaa. (Ferraro ym. 2004.)

ESBL-kiekkotesti antoi 318 bakteerikannalle 156 positiivista ja 162 negatiivista ESBL -tulosta. Näihin tuloksiin verrattuna Vitek2 antoi kolme väärää negatiivista ESBL-tulosta. Nämä kaikki olivat *K. pneumoniae* -kannoilla saatuja tuloksia. Lisäksi Vitek2 antoi *K. pneumoniae* -kannoille yhden, ja *E. coli* -kannoille kaksi väärää positiivista ESBL-tulosta. Laitteen sensitiivisyys ja spesifisyys olivat molemmat 98 %. 29 vaikeasti tunnistettavasta ESBL-positiivisesta kannasta Vitek2 tunnisti 27 oikein. Vääriä negatiivisia tuloksia laite antoi kaksi. Vitek2 ESBL-testi kesti keskimäärin 6,3 tuntia. Minimiaika oli 5,3 tuntia ja maksimiaika 10,4 tuntia. Johtopäätöksenä tuloksista voitiin sanoa, että Vitek2-laitteen ESBL-testi on nopea ja luotettava testi *E. coli*, *K. pneumoniae* ja *K. oxytoca* -kannoille. (Ferraro ym. 2004.)

Funke ym. selvittivät vuonna 2006 tutkimuksessaan ”Performance of the New VITEK[®] 2 NH Card in a Routine Clinical Laboratory” Vitek2:n NH-kortin soveltuvuutta kliinisten laboratorioiden käyttöön rutiinidiagnostiikassa. Kasvuolosuhteiltaan vaativien gramnegatiivisten ja epätasaisesti värjäytyvien bakteerien identifiointiin suunniteltua Vitek2 NH -korttia testattiin kolmen kuukauden aikana 178 uudella eri sukuihin kuuluvalla bakteerikannalla. Vitek2-laitteella saatuja tuloksia verrattiin muilla menetelmillä saatuihin tuloksiin. Näihin menetelmiin kuuluivat ApiCampy, Api20E, RapID32 STREP, ApiNH ja 16S rRNA-geenisekvenointi. 71 kannan kohdalla käytettiin uuden NH-kortin rinnalla vanhempaa Vitek NHI -korttia. 147 kannalla (83 %) 178 kannasta tulokset olivat yhtenevät NH-kortilla ja vertailumenetelmillä. 27 kannan (15 %) kohdalla oikea tulos saatiin lisätestien avulla. Kahdelle kannalle (1 %) NH-kortilla ei saatu tulosta ja kahden kannan (1 %) kohdalla tulokset olivat eriävät NH-kortilla ja vertailumenetelmillä. Vitek NHI antoi vain 44 %:lle kannoista suoraan tuloksen. 49 %:lle kannoista täytyi suorittaa lisätestejä lopullisen tuloksen saamiseksi. 7 %:lle kannoista ei saatu tulosta. Tutkimuksessa Vitek2 NH -kortti osoittautui hyödylliseksi kasvuolosuhteiltaan vaativien gramnegatiivisten ja epätasaisesti värjäytyvien bakteerien identifioinnissa. (Funke ym. 2006.)

Aiempien tutkimusten perusteella Vitek2-laite tunnisti gramnegatiiviset sauvabakteerit erinomaisesti. Lisäksi Vitek2-laitteen antamat antibioottiherkkyystulokset olivat yli 95 prosenttisesti vastaavia kuin kiekkomenetelmillä saadut tulokset. Vitek2 tunnisti ESBL-ominaisuuden hyvin tutkituista bakteerikannoista. Uusi NH-identifikaatiokortti tunnisti tutkitut bakteerikannat ilman lisätestejä huomattavasti paremmin kuin aiemmin käytetty NHI-identifikaatiokortti. Se soveltuu hyvin kliinisten laboratorioden rutiinidiagnostiikan käyttöön. Kaikkien mukaan ottamiemme tutkimusten perusteella Vitek2-laite näyttäisi suoriutuvan nopeasti ja luotettavasti bakteerien identifikaatio- ja herkkyysmäärittämisestä.

9 TUTKIMUSONGELMAT

Tutkimme opinnäytetyössämme, kuinka Vitek2-laitteen antamat identifikaatiotulokset täsmäävät perinteisillä tunnistusmenetelmillä saatuihin tuloksiin. Tutkittava aihe nousi laboratorion halusta selvittää, kuinka hyvin Vitek2-laite tunnistaa bakteerikantoja, jotka on vaikea diagnosoida rutiinimenetelmillä. Samalla Vitek2-laiteeseen on kehitetty uusia identifikaatiotestikortteja, joiden toimivuutta halutaan testata. Moni käyttämistämme bakteerikannoista on jäänyt identifioimatta rutiinimenetelmillä lajitasolle asti, koska niistä ei oltu tehty tarkempaa DNA-tason määrittystä. Sen vuoksi havainnoimme vain, mitä eri menetelmät antavat tuloksiksi ja vastaavatko nämä tulokset toisiaan. Emme tee tulosten perusteella päätelmiä siitä, ovatko Vitek2-laitteen antamat tulokset oikeellisia vai eivät.

Tutkimme myös, kuinka rutiinimenetelmien ja Vitek2-laitteen antamat yksittäiset identifikaatiotestireaktiot vastaavat toisiaan. Rutiinimenetelmien testireaktiotulokset oltiin aiemmin saatu pääasiassa Api20E ja Api20NE-testeillä. HUSLABin omana mielenkiinnon kohteena oli lisäksi seurata, millaisia reaktiotuloksia tutkittavat bakteerikannat saavat ja sopivatko ne niille ominaisiin tuloksiin. Itse emme lähde reaktioita näin tarkasti tulkitsemaan.

Vertaamme molempien menetelmien antamia antibioottiherkkyystuloksia eri kefalosporiineilla toisiinsa. Yksittäisenä vertailtavana kohteena tutkimme, kuinka Vitek2-laite tunnistaa ESBL-ominaisuutta. Tämän ominaisuuden tutkiminen on tärkeää, koska

ESBL-kannat ovat lisääntyneet viime vuosina nopeasti ja niiden tunnistamiseen on kehitetty Vitek2-laitteen uusi AST-N041-antibioottiherkkyyskortti. Lisäksi laskemme, kuinka kauan laitteen suorittamat identifikaatio- ja antibioottiherkkyystestit kestävät, sillä tieto on tärkeä mikäli laite aiotaan hankkia vakituiseen käyttöön bakteriologian laboratoriossa.

10 TUTKIMUKSEN SUORITUS

Opinnäytetyömme käytännönosuus koostui pääosin bakteerien kasvatuksesta ja niiden ajamisesta Vitek2-laitteella. Tulosten käsittely ja merkitseminen taulukko-ohjelmaan oli myös tärkeä osa työmme suoritusta. Työn käytännönosuus HUSLABin bakteriologian laboratoriossa kesti noin neljä viikkoa. Ensimmäisten päivien aikana tutustuimme bioMérieux Suomi Oy:n tuotespecialisti Juha Millerin ohjauksella enemmän Vitek2-laitteen toimintaan.

10.1 Tutkimuksessa käytettävien bakteerikantojen valinta

Halusimme työssämme tutkia erityisesti sitä, kuinka hyvin Vitek2 tunnistaa sellaisia bakteerikantoja, joiden tunnistus normaaleilla biokemiallisilla testeillä tai antibioottiherkkyystesteillä on vaativaa. Tällaisia kantoja ovat muun muassa nonfermentatiiviset pseudomonaksen kaltaiset gramnegatiiviset sauvabakteerit, jotka eivät käytä sokereita tehokkaasti hyväkseen. Myös kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit voivat olla nonfermentatiivisia ja niiden viljely on vaikeaa. ESBL-kannoilla antibioottiherkkyudet ovat normaalista poikkeavat. Kantoja on useita erilaisia ja näytteen tulkinta ESBL:ksi voi olla vaativaa. (Puohimiemi 2006.)

Sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi valitsi tutkittavat bakteerit kattavasti siten, että mahdollisimman monta erityyppistä tapausa saataisiin mukaan tutkimukseen. Mielienkiintoa herättivät erityisesti ne tapaukset, joissa joko bakteerin identifikaation tai antibioottiherkkyuden tulkinta on jäänyt aiemmin rutiinimenetelmillä epäselväksi. Mukaan tutkimukseen valittiin myös sellaisia bakteereita, jotka eivät sisälly Vitek2-laitteen GN ja NH -identifikaatiokorttien tutkimusvalikoimaan. Silloin kun laitetta käytetään uusien löydösten diagnosointiin, voidaan etenkin kasvuolosuhteiltaan vaativien baktee-

rien kohdalla haju- ja ulkonäkökriteerien perusteella erehtyä käyttämään väärää Vitek2-laitteen identifikaatiokorttia. Vitek2 ei tunnista kyseisiä bakteereita, mutta ainakin nähdään, minkälaisia reaktioita ne antavat. Opinnäytetyössämme vertaamme näitä reaktiotuloksia rutiinimenetelmillä saatuihin tuloksiin. (Puohimiemi 2006.)

Tutkimukseen otettiin mukaan KTL:ssä geenitesteillä varmistettuja ESBL-kantoja. Näistä kannoista voidaan siis varmasti sanoa, että niillä on ESBL-ominaisuus ja Vitek2-laitteen tulisi tunnistaa ne hyvin. *Escherichia coli* -ESBL kantoja oli 33 ja ESBL-klebsielloja 15. Tunnettujen ESBL-kantojen lisäksi tutkimukseen otettiin mukaan 28 tavallisesta poikkeavaa, mahdollisesti ESBL-kannoiksi luettavaa bakteerikantaa. Ne saattoivat esimerkiksi täyttää vain joitakin klassisten ESBL-kantojen kriteereistä, olla ESBL-tulkinnan äärialueella tai olla normaalia resistentimpiä. Suurin osa näistä kannoista oli *E. coli* tai *Klebsiella* -lajeja. Lisäksi niihin kuului *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter*-laji ja *Morganella morganii*. Joissain tapauksissa bakteeria ei oltu saatu normaaleilla menetelmillä identifioitua kuin koliformi-tasolle, vaikka herkkyyden perusteella ne on voitu vastata ESBL-kannoiksi. Haluamme selvittää, mitä laite antaa näissä tapauksissa bakteerin identifikaatioksi ja herkkyydeksi. Myös *Klebsiella oxytogan* mahdollisia K1-entsyymien tuottajia otettiin tutkimukseen. Ne muistuttavat ESBL-kantoja ja on hyvä nähdä erottaako laite ne oikeista ESBL:stä. (Puohimiemi 2006.)

Pseudomonaksen kaltaisia nonfermentatiivisia bakteereita otettiin mukaan 40. Useiden kantojen identifikaatio oli aiemmin jäänyt rutiinimenetelmillä epäselväksi. Monet bakteereista oli aikaisemmin nimetty vain pseudomonaksen kaltaisiksi gramnegatiivisiksi sauvoiksi. Osaan vastauksista oli liitetty mukaan mahdollinen bakteerilaji. Moni bakteeri oli tunnistettu hyvin lajitasolle asti, mutta niiden harvinaisuuden ja nonfermentatiivisten testireaktioiden takia oli hyvä tutkia, kuinka laite ne tunnistaa. (Puohimiemi 2006.)

Mukaan valittiin useita kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja. Näitä kantoja oli yhteensä 41. Tutkimukseen sisällytettiin myös 26 uutta, samaan aikaan opinnäytetyön käytännön osuuden kanssa tullutta potilasnäytelöydöstä. Ne olivat suurimmaksi osaksi *Escherichia coli* ja *Klebsiella* -bakteereja. Mukana oli myös *Yersinia pseudotuberculosis* ja *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Aluksi tutkimukseen mukaan valitut uudet potilasnäytteet olivat rutiinimenetelmien perusteella selviä ESBL-tapauksia. Myöhemmin tutkittiin vaikeammin tunnistettavia ESBL-kantoja tai muuten poikkeuksellisen

antibioottiherkkyuden omaavia bakteerikantoja sekä harvinaisempia bakteerilajeja. Työssämme tutkittavia bakteerikantoja on yhteensä 183. (Puohimiemi 2006.)

10.2 Työn suoritus

Etsimme aluksi tutkittavat bakteerikannat talletusnumeroiden perusteella pakastimesta (-70°C). Viljelimme ESBL-kannat CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) -maljoille ja pseudomonaksen kaltaiset nonfermentatiiviset bakteerit suklaamaljoille. Kyseiset maljat ovat bioMérieux:n GN-testikortilla tutkittaville, gramnegatiivisille sauvabakteereille suosittelemia viljelyalustoja. BioMérieux suosittelee, että kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit viljellään tryptikaasi-soija-agar-maljalle, jossa on viisi prosenttia lampaanverta, suklaamaljalle tai suklaa-polyvitex-agar-maljalle (bioMérieux 2005b: 4-20). Viljelimme suositusten mukaisesti HACEK-ryhmän bakteerit sekä muut kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit suklaa-maljoille. Kampylobakteerit viljelimme kuitenkin niille tarkoitetuille CAMP-maljoille. Merkitsimme jokaisessa työvaiheessa näytenumeron käyttämiimme maljoihin ja putkiin. (bioMérieux 2005b: 1 – 24, 1 – 25.)

ESBL-kantoja ja pseudomonaksen kaltaisia bakteereja kasvatimme 35°C:ssa yhden vuorokauden ajan. Jotkin pseudomonaksen kaltaiset bakteerit vaativat kahden vuorokauden kasvatuksen. *Gardnerella vaginalis* vaati anaerobisen kasvuympäristön. Anaerobinen kasvatusympäristö saadaan aikaan kasvatusastiaan käyttämällä kemiallista anaerobioosin kehittäjä, joka sitoo itseensä hapen ja vapauttaa hiilidioksidia ja vetyä. Kampylobakteerit kasvatimme 42°C:ssa mikroaerofiilisissä olosuhteissa. Mikroaerofiilisessä kasvatusatmosfäärissä on 5-10 % hiilidioksidia ja korkeintaan 6 % happea. Kasvatusastiaan luodaan oikea atmosfääri kaupallisella kaasunkehittimellä. Muut kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit kasvatimme 35°C:ssa CO₂-kaapissa, jonka hiilidioksidipitoisuus oli 5 %. Kasvatimme kaikkia vaativia bakteereja kaksi vuorokautta. Muutama näistä bakteereista vaati kolmen vuorokauden kasvatuksen. Teimme jokaisesta näytteestä vielä uudet puhtasviljelmät, jotta bakteerien elinkyky palautuisi pakastuksen jälkeen kunnolla ennalleen ja niiden aikaansaamat testireaktiot olisivat luotettavia. (HUSLAB 2003.)

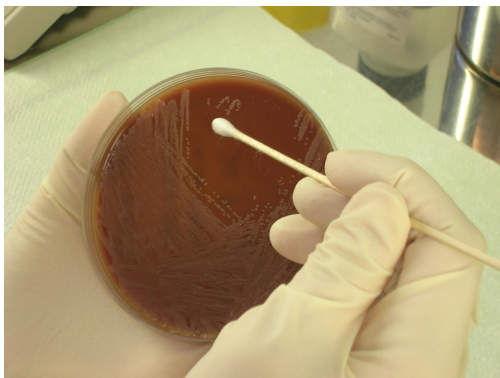
Tutkimme kaikki käytettävät bakteerikannat Vitek2-laitteella ja vertasimme saatuja tuloksia aikaisemmin rutiinimenetelmillä saatuihin tuloksiin. Aikaisemmat tutkimustulokset etsimme potilastietojärjestelmästä. Teimme kaikista ESBL-kannoista antibiootti-

herkkyysmäärittelyn kahdella eri herkkyyskortilla (AST-N041 ja AST-N029). Gram-negatiivisiin sauwabakteereihin kuuluvien ESBL- ja pseudomonasnäytteiden sekä uusien potilasnäytteiden identifikaatiot tutkimme GN-testikortilla. Kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit tutkimme NH-identifikaatiotestikortilla. Pseudomonaksen kaltaisista ja kasvuolosuhteiltaan vaativista bakteereista teimme ainoastaan identifikaatiomääritykset. Bakteriologian laboratorio ei halunnut tässä tutkimuksessa selvittää kyseisten kantojen antibioottilherkkyyden luotettavuutta Vitek2-laitteella.

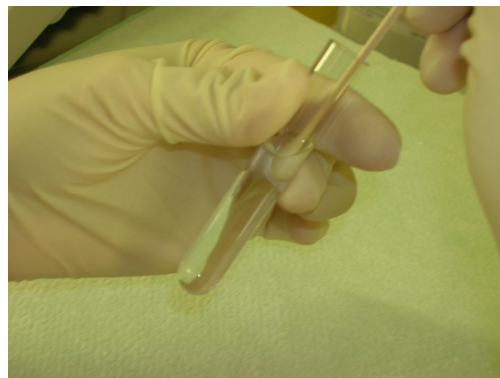
Useimmat bakteerit kasvoivat vuorokauden jälkeen hyvin puhtasviljelymaljalla. Tapauksissa, joissa epäilimme näytteessä kasvavan väärää bakteeria tai useampaa eri bakteerikantaa teimme gramvärjäyksiä ja erilaisia pikatestejä, kuten oksidaasi-, katalaasi- ja indolitestejä. Bakteerikannat antavat niille ominaisia testireaktioita, joiden perusteella pystyimme päättämään, kasvoiko maljalla todennäköisesti oikeaa bakteeria. Ajanpuutteen vuoksi emme lähteneet tarkemmin identifioimaan taltioituja bakteerikantoja.

Identifikaatio- ja antibioottilherkkyyssmäärittysten suoritusta varten tarvitsimme Vitek2-laitteelle tarkoitettuja näyteputkia, näytekasetin, ID- ja antibioottilherkkyysskortteja, pumpulitikkuja ja steriiliä natriumkloridiliuosta. Natriumkloridiliuosta ja testikortteja säilytimme jääkaapissa. Niiden piti ennen määrittysten tekoa lämmetä huoneenlämpöiseksi. Valmistimme bakteereista ja natriumkloridiliuoksesta suspensiot putkiin. Asetimme ne näytekasettiin yhdessä kullekin bakteerille tarkoitettujen identifikaatio- ja antibioottilherkkyysskorttien kanssa. Suoritimme työvaiheet vetokaapissa mahdollisten kontaminanttien välttämiseksi.

Annostelimme jokaiseen näyteputkeen 3 ml steriiliä 0,45 % natriumkloridiliuosta bakteerisuspensiota varten. Oikeassa annostelussa käytimme apuna Dispensette®-pumppua. Putket asetimme niille tarkoitettuun näytekasettiin. Sen jälkeen poimimme pesäkkeitä pumpulitikun avulla viljelymaljoilta (kuvio 15). Tikussa olevan bakteerimassan sekoitimme natriumkloridiliuokseen pyörittäen tikkua putken seinämää vasten (kuvio 16). Sekoitimme putket vielä Vortex:lla, jotta suspensiosta tulisi homogeeninen. Suspension vahvuuden mittasimme Densichek-laitteen avulla. NH-identifikaatiokorttia käytettäessä suspension tuli olla McFarland 2,70-3,30 vahvuinen, ja GN-korttia käytettäessä McFarland 0,5-0,63 (bioMérieux 2005b: 1 – 4, 4 – 4). Putkesta olevasta suspensiosta teimme viljelyn perämaljalle varmistuaksemme tutkimamme bakteerin puhtaudesta.



KUVIO 15. Bakterisuspension valmistamiseksi poimimme maljalta bakteeripesäkkeitä pumpulitikulla.



KUVIO 16. Sekoitimme bakteeripesäkkeet putkissa olevaan natriumkloridiliuokseen.

Perämaljoina käytimme samoja maljoja kuin puhtasviljelyssäkin. Myös kasvuolosuhteet olivat samat. Tarkistimme maljat aina seuraavana päivänä. Lisäksi teimme joka päivä käyttämästämme natriumkloridiliuoksesta bakteeriviljelyn verimaljalle, jotta tietäisimme varmasti sen olevan steriiliä.

Suspension valmistamisen jälkeen, asetimme kasettiin kunkin bakterisuspensioputken taakse sille tarkoitetun ID-kortin (NH- tai GN-kortti) siten, että kortin siirtoputki tuli putkessa olevaan suspensioon. Niille bakteereille, joille teimme antibioottiherkkyystutkimukset, asetimme kaksi tyhjää putkea suspensioputken viereen. Näiden putkien taakse laitoimme AST-N029 ja AST-N041 -kortit. Asetettuamme kaikki näytteet näytekasettiin, nostimme kasetin kuviossa 17 näkyvään Smart Carrier -työasemaan, jossa näyte-numero ja testikorttien viivakoodit luetaan viivakoodinlukijalla tai syötetään käsin näytekasetin muistikortille. Lopuksi asetimme näytekasetin Vitek2-laitteeseen ja suljimme laitteen kannen (kuvio 18). Laite aloittaa automaattisesti näytteiden analysoinnin. Näytekasetti täytyi asettaa laitteeseen identifikaatiotutkimuksissa 30 minuutin sisällä, ja antibioottiherkkyystutkimuksissa 60 minuutin sisällä suspensioiden valmistamisesta (bioMérieux 2005b: 1 – 4, 4 – 4, 1 – 24). Myöhemmin poistimme käytetyt testikortit, näytekasetit ja -putket laitteesta.



KUVIO 17. Smart Carrier -työaseman ja viivakoodinlukijan avulla siirsimme näytteiden ja testikorttien tiedot muistikortille.



KUVIO 18. Asetimme näytekasetin Vitek2-laitteeseen.

Käytimme laaduntarkkailunäytteenä identifikaatiomäärityksessä bioMérieux:n suosittelemaa *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324 -kantaa. Herkkyysmääritystulosten luotettavuus tarkastettiin *Escherichia coli* ATCC 25922 -kannalla. Tarkistimme, että käytetyt testikortit kuuluivat samaan valmistuserään. Tarkastimme joka aamu ennen työn aloittamista Densichek-laitteen toimivuuden Densichek Calibration Standardin avulla.

10.3 Tulosten käsittely

Vitek2-laite antaa jokaisen näytteen identifikaatio- ja antibioottilherkkyystulokset sekä sähköisesti että paperitulosteena. Tulokset näkyvät Vitek2-laitteeseen yhdistetyllä tietokoneella. Vitek2-laitteen identifikaatiopaperitulosteen (liite 1) yläosaan on merkitty näytenumero, käytetty testikortti sekä tuloksiin kulunut aika. Tuloste koostuu testireaktiotaulukosta ja lopullisesta identifikaatiotuloksesta. Testireaktiotaulukkoon on merkitty kunkin reaktion tulokset positiivisina, negatiivisina tai epäselvissä tapauksissa kysymysmerkkeinä. Tulosteesta selviää Vitek2-laitteen bakteerille määrittämä nimi ja prosentti, joka kertoo identifikaation luotettavuuden. Myös mahdolliset laitteen pyytämät lisätestit näkyvät tulosteessa.

Herkkyyismääritystulosteessa (liite 2) näytetiedot on merkitty samalla tavalla kuin identifikaatiotulosteessa. Antibioottiherkkydet on ilmoitettu sekä MIC-arvoina, että vastavina S-I-R-luokituksen mukaisina arvoina. Herkkyismääritystulokset näkyvät tulosteessa sekä niin sanottuina raakatuloksina että Vitek2-laitteen AES-tietojärjestelmän ehdottamina bakteerin resistenssimekanismin mukaan tulkittuina tuloksina. Raakatulokset ovat tarkkoja Vitek2-laitteen mittaamia MIC-arvoja. AES-tietojärjestelmä ilmoittaa kaikki muutkin antibiootit, joille kyseisen resistenssimekanismin omaava bakteeri yleensä on resistentti. Käytettäessä AES-tietojärjestelmän ehdottamia tuloksia laite muuttaa kyseiset antibioottiherkkyystulokset resistenteiksi. Laitteen käyttäjä saa valita kumpia tuloksia haluaa käyttää. Sen perusteella Vitek2-laite antaa lopullisen antibioottiherkkyismääritystuloksen. Antibioottiherkkyystulosten mukana tulostuu myös tarkempi selvitys bakteerin mahdollisista resistenssimekanismeista.

Vitek2 ei antanut paperitulostetta, jos laite ei tunnistanut bakteeria, bakteerin lopulliseen tunnistamiseen olisi vaadittu lisätestejä tai jos herkkyystulos ei AES-tietojärjestelmän mukaan sopinut tutkittavalle bakteerille. Silloin kun Vitek2 ei saanut annettua bakteerille tarkkaa nimeä, se ei pystynyt yhdistämään mitattuja herkkyystuloksia mihinkään tiettyyn bakteerilajiin ja siten herkkyystulosten tarkempi S-I-R-luokituksen mukainen tulkinta jää laitteelta kokonaan tekemättä. Laitteelle voi kuitenkin syöttää manuaalisesti oikean nimen, jos se on tiedossa. Meidän piti hyväksyä herkkyystulokset ennen lopullisen tuloksen saamista, mikäli Vitek2 oli tunnistanut tietyn bakteerin ESBL-kannaksi. Silloin AES-järjestelmä oli huomioinut ESBL-ominaisuuden ja muuttanut tämän vuoksi tietyt antibioottitulokset resistenteiksi.

Perinteisillä menetelmillä saadut tulokset haimme HUSLABin potilastietojärjestelmästä. Kirjasimme kummallakin eri menetelmillä saadut tulokset ylös ja vertasimme niiden vastaavuutta. Käyttämämme bakteerikannat oli tunnistettu pääosin pelkillä rutiinimenetelmillä vain siihen asti, mikä on kliinisesti tärkeää tai rutiinimenetelmillä mahdollista. Kaikkia kantoja ei oltu varmistettu geenitesteillä, joten oikeista tuloksista ei ollut täyttä varmuutta. Siksi tutkimme vain Vitek2-laitteen ja perinteisten menetelmien antamien tulosten vastaavuutta. Perinteisillä menetelmillä saadut tulokset haimme HUSLABin potilastietojärjestelmästä. Kirjasimme kummallakin eri menetelmillä saadut tulokset ylös ja vertasimme niiden vastaavuutta. Tulkitsimme identifikaatiotuloksia eri ryhmissä, joita olivat tunnetut ESBL *Escherichia coli* ja *Klebsiella* -kannat, pseudomonakset ja sen kaltaiset gramnegatiiviset sauvabakteerit, kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit

sekä uudet potilasnäytelöydökset. Laskimme prosentteina, kuinka usein Vitek2-laite antoi saman tuloksen kuin perinteiset menetelmät. Merkitsimme ylös myös tapausten yhteismäärän. Laite ehdotti tehtäväksi lisätestejä joistain näytteistä tarkemman identifi- kaation saamiseksi. Emme tehneet mitään laitteen ehdottamia lisä- tai uusintatestejä resurssien ja ajanpuutteen vuoksi. Siten saimme laitteen antamat tulokset suoraan, ilman että olisimme tarkentaneet niitä manuaalisesti tehdyillä testeillä. Kirjasimme ylös myös laitteen ilmoittaman prosenttilukeman bakteeri-identifikaation luotettavuudesta ja sen, kuinka monta tuntia identifikaatiotuloksen saaminen Vitek2-laitteella kesti.

Potilastietojärjestelmästä löytyi aikaisemmin tehdyistä Api-tutkimuksista numeerinen tulos, jonka merkitsimme bioMérieux:n Apiweb®-internettietokantaan. Saimme sieltä yksittäiset reaktiotulokset. Kirjasimme Excel-taulukko-ohjelmaan ne reaktiot, jotka oli- vat yhteisiä molemmille menetelmille ja vertasimme, tuliko niistä sama tulos. Yhteisiä reaktioita Api20E:llä ja Vitek2-laitteen GN-identifikaatiokortilla olivat LDC, ODC, CIT, H₂S, URE, GLU (glucose fermentation/oxidation), MAN (mannitol fermentati- on/oxidation), SOR (sorbitol fermentation/oxidation) ja SAC (saccharose fermentati- on/oxidation) (bioMérieux 2004a). Yhteisiä reaktioita Api20NE:llä ja Vitek2-laitteen GN-identifikaatiokortilla olivat GLU, URE, MNE (mannose assimilation), MAN (man- nitol assimilation), MAL (maltose assimilation) ja CIT (trisodium citrate assimilation) (bioMérieux 2004b).

Kirjasimme vain Api20E ja Api20NE -testeillä aiemmin tunnistettujen bakteerien reak- tiotulokset, koska muilla menetelmillä tunnistettuja bakteerikantoja oli luotettavaa ver- tailua varten liian vähän. Muita aiemmin käytettyjä tunnistustestejä olivat esimerkiksi RapID NH, RapID NF ja RapID ANA. Joistain näytteistä oli jäänyt reaktiotulos kirjaa- matta, joten ne täytyi jättää tulosten tulkinnasta pois.

Antibioottiherkkyystulokset kirjasimme vain kefalosporiineihin kuuluvien antibioottien osalta, koska ne osoittavat parhaiten, onko kyseessä ESBL. Näitä antibiootteja olivat kefalotiini (KF), kefuroksiimi (CXM), kefotaksiimi (CTX), keftatsidiimi (CAZ), kefpo- doksiimi (CP), kefepiimi (CEF) ja kefoksitiini (CX). Antibioottiherkkyyskiekkojen es- torenkaiden tarkat millimetrilukemat haimme potilastietojärjestelmästä. Saimme raja- arvot eri antibioottiherkkyyskiekkojen S-I-R-luokitukselle KTL:n FiRe-standardin anti- bioottitaulukosta (FiRe 2005). Vitek2 antaa sekä tarkat niin sanotut raakatulokset että AES-tietojärjestelmän pidemmälle tulkitsemat antibioottiresistenssitulokset. Kirjasimme

ne Vitek2-laitteen antamat raakatulokset, joita AES-tietojärjestelmä ei ollut muuttanut resistenssimekanismin mukaisiksi, koska halusimme verrata molempien menetelmien antamia tarkkoja mittaustuloksia. Kaikille Vitek2-laitteen antamille herkkyystuloksille ei löytynyt vertailukohdetta rutiinimenetelmillä saaduista tutkimustuloksista. Kefoksiini ei ole vielä käytössä Suomen rutiinidiagnostiikassa ja kefpodoksiimia käytetään vain ESBL:n seulontaan (Puohiniemi 2006). Käytimme osittain Rantakokko-Jalavan ym. Turussa vuonna 2006 tehdyssä tutkimuksessa käytettyä taulukkoa mallina omien antibioottil herkkyystulostemme tulkinnassa. ESBL-tulosten sensitiivisyyden ja spesifiisyyden laskimme Ferraron ym. tutkimuksessa esitetyillä kaavoilla.

11 TUTKIMUSTULOKSET

Tutkimuksessa käytettiin osaksi haastavia, ei aina lajitasolle asti tunnistettuja bakteerikantoja, jotka vaikeuttivat tulosten arviointia. Identifikaatiotuloksissa otettiin huomioon ainoastaan sellaiset bakteerikannat, joiden tulosten vertailu rutiinimenetelmien ja Vitek2-laitteen välillä oli mahdollista. Opinnäytetyössämme tutkittiin kuitenkin myös sellaisia bakteerikantoja, joiden identifikaatiotuloksia ei ollut mahdollista vertailla. Näiden kantojen identifiointi oli jäänyt aiemmin rutiinimenetelmällä vaillinaiseksi tai Vitek2-laitteen testikorttien ei kuulunut niitä edes tunnistaa. Kyseisistä kannoista haluttiin tutkia muita asioita, kuten reaktiotuloksia ja määrittelyyn kuluneita aikoja. Tulosten prosenttiosuuksien pyöristyksestä johtuen yhteen lasketut prosenttiosuudet saattoivat ylittää sata prosenttia.

11.1 Identifikaatiotulokset

Vitek2 identifioi erittäin hyvin geenitesteillä varmennetut, ESBL-kantoihin kuuluvat *Escherichia coli* ja *Klebsiella* -lajit sekä uudet potilasnäytelöydökset. Laite tunnisti hyvin myös muut, mielenkiintoisiin ESBL-kantoihin kuuluvat bakteerilajit. Kaikista tutkituista ESBL-kannoista ja uusista potilasnäytelöydöksistä Vitek2 tunnisti oikein 97 (98 %) lajitasolle asti. Noin 70 prosenttia sekä pseudomonasten kaltaisten että kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerien tuloksista vastasivat eri menetelmillä toisiaan.

Pseudomonaksen kaltaisten ja kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerien joukossa oli enemmän tapauksia, jotka vaikeuttivat tulosten keskinäistä vertailua. Vertailukelpoisia eri menetelmillä saatuja identifikaatiotuloksia tutkimuksessamme oli yhteensä 157 kappaletta, joista Vitek2 tunnisti 138 (88 %) samalla tavalla kuin rutiinimenetelmät. Tutkituista bakteerikantoja oli yhteensä 183.

Taulukosta 1 selviää, että Vitek2-laite antoi oikean identifikaation kaikille *Escherichia coli* -kannoille, joilla on geenitesteillä varmistettu ESBL-ominaisuus. Samoin Vitek2 tunnisti oikein kaikki tunnetut ESBL-klebsiellat lajitasolle asti. Vitek2 identifioi täydellisesti lajitasolle asti 96 prosenttia ei-geenitesteillä varmennetuista ESBL-kannoista eli 24 näytettä 25:stä. Yksi näistä kannoista oli *Aeromonas hydrophila*, jonka Vitek2 tunnisti periaatteessa oikein, mutta GN-testikortin kuuluu tunnistaa kanta vain *Aeromonas hydrophila/caviae* -tasolle asti. Yhden näytteen laite tunnisti rutiinimenetelmiä tarkemmin lajitasolle. Yhdestä (4 %) näytteestä Vitek2 antoi eri tuloksen kuin rutiinimenetelmät. Uusista potilasnäytelöydöksistä Vitek2 tunnisti 25 tapausa eli 96 prosenttia samalla tavalla kuin rutiinimenetelmät. Yhtä näytettä (4 %) laite ei tunnistanut.

TAULUKKO 1. Tunnettujen *Escherichia coli* ja *Klebsiella* ESBL-kantojen, muiden ESBL-kantojen ja uusien potilasnäytelöydösten identifikaatiotulosten vastaavuus rutiinimenetelmillä ja Vitek2-laitteella.

	ESBL- <i>E.coli</i>		ESBL- <i>Klebsiella</i>		muut ESBL-kannat		uudet potilasnäytteet	
	n	%	n	%	n	%	n	%
vastaavat tulokset	33	100	15	100	24	96	25	96
eriävät tulokset	0	0	0	0	1	4	1	4
yht.	33	100	15	100	25	100	26	100

Kolme näytettä oli aiemmin tunnistettu rutiinimenetelmillä vain koliformi sauva -tasolle. Vitek2 tunnisti ne *Escherichia coli* -nimellä. Kyseisiä *E. coli* -kantoja ei otettu taulukoinnissa huomioon, koska näiden eri menetelmillä saatujen tulosten vertaileminen olisi ollut hankalaa, eikä tulosten vastaavuudesta olisi voitu olla varmoja.

Tutkituista pseudomonaksen kaltaisista gramnegatiivisista sauvoista 17 näytettä on tunnistettu rutiinimenetelmillä vain pseudomonaksen kaltaisiksi sauvoiksi. Näistä suurimmalle osalle on kuitenkin annettu todennäköinen lajinimi, johon vertaamme Vitek2-laitteen antamia tuloksia. Taulukosta 2 nähdään, että Vitek2 tunnisti kannoista oikein 19

(73 %) lajitasolle asti. Näistä yksi näyte oli aiemmin tunnistettu rutiinimenetelmillä vain sukutasolle asti. Seitsemän näytteen (27 %) kohdalla Vitek2-automaatin ja rutiinimenetelmien antamat tulokset poikkesivat toisistaan.

TAULUKKO 2. Pseudomonasten ja pseudomonasten kaltaisten gramnegatiivisten sauvabakteerien tunnistustulosten vastaavuus rutiinimenetelmillä ja Vitek2-laitteella.

	n	%
vastaavat tulokset	19	73
eriävät tulokset	7	27
yht.	26	100

Taulukoinnissa huomioon otettujen kantojen lisäksi tutkimme kantoja joiden identifikaatiotuloksia olisi ollut vaikeaa verrata eri menetelmien kesken. Kuudelle näytteelle ei oltu rutiinimenetelmillä ehdotettu tarkennettua lajinimeä, mutta Vitek2 tunnisti ne erillaisiksi pseudomonaksen kaltaisiin kuuluviksi lajeiksi. Lisäksi kahdeksan tutkimuksessa käytetyn kannan kohdalla voidaan varmasti sanoa, että Vitek2-laitteen GN-kortti ei niitä tunnista. Tutkimme kyseiset kannat, jotta näkisimme niiden antamat reaktiotulokset. Pseudomonaksiin ja pseudomonaksen kaltaisiin sauvabakteereihin lukeutuvia kantoja olisi ollut yhteensä 40, jos vaikeasti tulkittavat kannat olisi otettu mukaan taulukointiin.

Tutkituista kasvuolosuhteiltaan vaativista bakteereista yhdeksän on tunnistettu rutiinimenetelmillä vain sukutasolle asti. Lajitason tunnistuksen puuttuessa suurimmalle osalle näistä bakteereista on annettu todennäköinen lajinimi, johon vertaamme Vitek2-laitteen antamia tuloksia. Taulukosta 3 käy ilmi, että Vitek2 tunnisti tutkimistamme kasvuolosuhteiltaan vaativista bakteereista 22 (69 %) samalla tavalla kuin rutiinimenetelmät. Yksi näistä näytteistä oli tunnistettu rutiinimenetelmillä vain *Campylobacter*-lajiksi. Vitek2 tunnisti sen myös kampylobakteeriksi; tarkemman lajinimen selvittämiseksi olisi pitänyt tehdä lisätestejä. Lisätestien avulla yhteensä viidessä tapauksessa (16 %) oltiin voitu saada lajitasolle asti sama nimi kuin rutiinimenetelmillä. Näistä kolmessa tapauksessa laite ehdotti pelkästään oikeaan sukuun kuuluvia lajeja. Viiden näytteen (16 %) kohdalla Vitek2-automaatin ja rutiinimenetelmien antamat tulokset poikkesivat toisistaan.

TAULUKKO 3. Kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerien identifikaatiotulosten vastaavuus Vitek2-laitteella ja rutiinimenetelmillä.

	n	%
vastaavat tulokset	22	69
eriävät tulokset	5	16
lisätesteillä mahdollinen oikea nimi	5	16
yht.	32	101

Taulukoinnissa huomioon otettujen kantojen lisäksi tutkimme yhdeksän bakteerikantaa, joiden identifikaatiotulosten vertailu Vitek2-laitteen ja rutiinimenetelmien välillä olisi ollut vaikeaa. Käytetyistä bakteerikannoista NH-testikortin ei kuulu tunnistaa kahdeksaa. Näistä viisi näytettä kuului sukuihin, joista Vitek2 tunnistaa vain muutamia lajeja, mutta juuri tutkittavaa lajia NH-testikortin ei kuulu tunnistaa. Kolmessa tapauksessa laite antoi kuitenkin samaan sukuun kuuluvan lajinimen. Kolme tutkittavista kannoista kuului *Pasteurella*-sukuun, joita Vitek2-laitteen ei kuulu ollenkaan tunnistaa NH-kortilla. Pasteurellat muistuttavat paljon *C. hominista* ja halusimme siksi nähdä, tunnistaaako Vitek2 kannat väärin *C. hominis* -lajiksi. Näin ei kuitenkaan tapahtunut. Yksi näyte oli tunnistettu rutiinimenetelmillä vain hemofiluksen kaltaiseksi sauvaksi. Vitek2-laitte antoi bakteerille nimeksi *Haemophilus influenzae*. Kantoja olisi ollut yhteensä 41, mikäli epäselvät tapaukset oltaisiin otettu mukaan.

Identifikaatiotesteistä eri menetelmillä saadut tulokset sekä Vitek2-laitteen tunnistusprosentit ja tulosten saamiseen kulunut aika näkyvät liitteessä 3. Liitteeseen on myös merkitty identifikaatiotulosten vastaavuus rutiinimenetelmillä ja Vitek2-laitteella. Liitteessä osa käyttämistämme bakteeriryhmistä on yhdistetty selvyiden vuoksi toisiinsa lajinimien mukaan. Vitek2 tunnisti tutkitut *Escherichia coli* ja *Klebsiella* -lajit erinomaisesti. Samoin muut *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvat *Citrobacter* ja *Morganella* -kannat Vitek2 tunnisti hyvin. Yhden rutiinimenetelmillä tunnistetun *Klebsiella oxytoca* Vitek2 tunnisti *Raoultella ornithinolytica* tai *Klebsiella pneumoniae* -lajiksi. Yhdelle *Klebsiella oxytoca* -näytteelle Vitek2 ei saanut annettua mitään nimeä.

Pseudomonaksen kaltaisten bakteerien tuloksissa oli enemmän eroavuuksia ja käytettyjen bakteerikantojen identifikaatiotuloksia oli vaikeampi verrata keskenään. *Acinetobacter baumannii* ja *A. baumannii/calcoaceticus* -nimillä tunnistetut kannat Vitek2 identifioi hyvin, mutta yhden lähinnä *Acinetobacter*-lajiksi tunnistetun bakteerin laite tunnistoi

Morganella morganii -lajiksi. *Alcaligenekseksi* tai sen kaltaiseksi lajiksi tunnistettu bakteeri sai Vitek2-laitteelta nimen *Delftia acidovorans*. *Brevundimonas vesicularis* tunnistettiin *Sphingomonas paucimobilis* -nimellä. Vitek2 identifioi erinomaisesti kaikki *Chryseobacterium*-sukuun kuuluvat kannat. Samoin *Myroides*-kantojen identifikaatiotulokset vastasivat molemmilla menetelmillä toisiaan. Tutkitut *Pseudomonas*-sukuun kuuluvat kannat Vitek2 tunnisti pääosin samalla nimellä kuin rutiinimenetelmät. Tutkitun *Pseudomonas luteolan* Vitek2 tunnisti kuitenkin *P. fluorescens* -lajiksi. *Ralstonia pickettii* -kannalle Vitek2 antoi nimeksi *Pseudomonas mendocina* ja *Sphingobacterium*-laji sai nimen *Chryseobacterium meningosepticum*. Vitek2 sai tunnistettua monet rutiinimenetelmillä vain pseudomonaksen kaltaisiksi gramnegatiivisiksi sauvoiksi nimetyt bakteerikannat *Pseudomonas*, *Myroides*, *Brevundimonas* tai *Acinetobacter* -sukuihin kuuluviksi lajeiksi.

Vitek2-laite tunnisti hyvin ne HACEK-ryhmään kuuluvat bakteerit, jotka kuuluvat NH-testikortin tunnistusvalikoimaan. Vitek2 ei kuitenkaan tunnistanut *Haemophilus parainfluenzae* -näytettä eikä yhtä *Haemophilus*-sukuun kuuluvaa lajia vaan antoi tuloksiksi unidentified ja nonreactive biobattern. Muista kasvuolosuhteiltaan vaativista bakteereista Vitek2 tunnisti kolme *Campylobacter jejuni* -kantaa samalla tavalla kuin rutiinimenetelmät. *Campylobacter fetus* sai Vitek2-laitteelta nimen *Campylobacter coli*. Rutiinimenetelmillä *Campylobacter*-lajiksi tunnistettu kanta sai Vitek2-laitteelta kolme nimivaihtoehtoa: *Neisseria cinerea*, *Neisseria meningitidis* tai *Kingella denitrificans*. Kolmen campylobakteerin kohdalla Vitek2 ehdotti lisätestejä erottaakseen *Campylobacter jejuni* ja *Campylobacter coli* -lajit toisistaan.

Kaksi tutkittua *Capnocytophaga*-suvun kantaa sai saman nimen molemmilla menetelmillä. Vitek2 identifioi kuitenkin lähinnä *Capnocytophaga canimorsus* -lajiksi tunnistetun kannan *Neisseria gonorrhoeae* -bakteeriksi. *Gardnerella vaginalis* -kantojen identifikaatiotulokset vastasivat molemmilla menetelmillä toisiaan. Samoin pääosin *Neisseria*-sukuun kuuluvien kantojen tulokset. Yksi lähinnä *Neisseria elongata*ksi rutiinimenetelmillä tunnistettu bakteeri sai laitteelta nimivaihtoehdot *Kingella denitrificans*, *Neisseria elongata* ja *Neisseria cinerea*. *Moraxella catarrhalis* -näytteen kohdalla Vitek2-laite antoi nimet *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ja *Neisseria cinerea*.

11.2 Reaktiotulokset

Suurin osa Api20E:n ja Vitek2-laitteen antamista tuloksista vastasivat toisiaan. Api20NE:n ja Vitek2-laitteen reaktiotulokset eivät vastanneet niin hyvin toisiaan kuin Api20E-testillä. Tulkinnessa mukana oli myös joko rutiinimenetelmien tai Vitek2-laitteen antamia tuloksia, joita ei voitu tulkita positiivisiksi eikä negatiivisiksi.

Taulukkoon 4 on kirjattu, kuinka hyvin Api20E-bakteeri-identifikaatiotestin ja Vitek2-laitteen reaktiotulokset vastaavat toisiaan. Tutkittuja näytteitä oli yhteensä 98 kappaletta. Rikki-, glukoosi-, sorbitoli- ja sakkaroositulokset vastasivat täydellisesti (100 %) toisiaan. Ureatuloksista 59 eli 60 prosenttia vastasivat toisiaan. 34 tapauksessa (35 %) Api20E ja Vitek2 antoivat eri ureatulokset. 33 näistä tapauksista Vitek2 antoi positiivisen tuloksen, vaikka Api20E:n tulos oli negatiivinen. Vitek2 antoi viisi ureatulosta, joita se ei osannut tulkita positiivisiksi eikä negatiivisiksi. Api20E antoi kaksi epäselvää LDC-tulosta. Reaktiotuloksia oli yhteensä 882. Pääosa (94 %) eri menetelmillä saadusta reaktiotuloksista vastasi toisiaan. 45 (5 %) tapauksessa tuli eri tulos. Eriävät tulokset johtuivat useimmiten ureatestistä. Epäselviä tuloksia oli yhteensä seitsemän (1 %).

TAULUKKO 4. Api20E-testin ja Vitek2-laitteen reaktiotulosten vastaavuus.

reaktio	sama tulos (%)	eri tulos (%)	epäselvä tulos (%)	yhteiskm.
LDC	89 (91)	7 (7)	2 (2)	98
ODC	97 (99)	1 (1)	0 (0)	98
CIT	97 (99)	1 (1)	0 (0)	98
H ₂ S	98 (100)	0 (0)	0 (0)	98
UREA	59 (60)	34 (35)	5 (5)	98
D-GLU	98 (100)	0 (0)	0 (0)	98
MAN	96 (98)	2 (2)	0 (0)	98
SOR	98 (100)	0 (0)	0 (0)	98
SAC	98 (100)	0 (0)	0 (0)	98
yht. (%)	830 (94)	45 (5)	7 (1)	882

Taulukosta 5 selviää, kuinka Api20NE-testin ja Vitek2-laitteen antamat tulokset vastaavat toisiaan. Tutkittuja näytteitä oli yhteensä 32 kappaletta. Mannitolitulokset vastasivat parhaiten (84 %) toisiaan. Glukoosituloksista vain 59 prosenttia oli yhteneviä. Vitek2 antoi 12 tapauksessa positiivisen glukoosituloksen, vaikka rutiinimenetelmällä testitulokset

oli negatiivinen. Yhdessä tapauksessa Vitek2-laitteen glukoositulos oli negatiivinen ja Api20NE:n positiivinen. Vitek2 antoi neljä (13 %) epäselvää ureatulosta. Epäselvät MNE- ja maltoositulokset olivat Api20NE:n antamia. Reaktiotuloksia oli yhteensä 192. 135 reaktiotulosta (70 %) oli yhtenevät eri menetelmillä ja 51 reaktiotulosta (27 %) erosivat toisistaan. Tuloksista yhteensä kuusi (3 %) oli epäselviä.

TAULUKKO 5. Api20NE-testin ja Vitek2-laitteen reaktiotulosten vastaavuus.

reaktio	sama tulos (%)	eri tulos (%)	epäselvä tulos (%)	yhteiskm.
GLU	19 (59)	13 (41)	0 (0)	32
URE	20 (63)	8 (25)	4 (13)	32
MNE	22 (69)	9 (28)	1 (3)	32
MAN	27 (84)	5 (16)	0 (0)	32
MAL	21 (66)	10 (31)	1 (3)	32
CIT	26 (81)	6 (19)	0 (0)	32
yht. (%)	135 (70)	51 (27)	6 (3)	192

11.3 Antibioottiherkkyystulokset

Vitek2-laitteen ja rutiinimenetelmien antamat herkkyystulokset kefalotiinille, kefuroksiimille, kefotaksiimille ja keftatsidiimille vastasivat suurimmaksi osaksi toisiaan. Silloin kun antibioottiherkkyystulokset erosivat toisistaan, Vitek2 antoi yleensä herkemman tuloksen kuin rutiinimenetelmät. Vitek2-laitteen eri testikortit antoivat ESBL-ominaisuuden suhteen noin 90 prosenttisesti samat tulokset kuin rutiinimenetelmät.

Taulukossa 6 vertaillaan normaalilla kiekkomenetelmällä saatuja antibioottiherkkyystuloksia Vitek2-laitteella saatuihin tuloksiin. Kiekkomenetelmän tilalla käytimme osassa tapauksissa Epsilontestiä, mikäli tulokset poikkesivat toisistaan. Epsilontesti on luotettavampi ja antaa tarkemmat tulokset, jotka ovat paremmin verrattavissa Vitek2-laitteen antamiin tuloksiin. Merkitsimme taulukkoon tapaukset, joissa eri menetelmät antoivat täysin toisistaan poikkeavat tulokset eli toinen antoi sensitiivisen (S) ja toinen resistentin (R) tuloksen. Lisäksi merkitsimme ne tapaukset, joissa eri menetelmien antamat tulokset poikkesivat vähemmän toisistaan eli toinen menetelmä antoi intermediate-tuloksen (I) ja toinen resistentin tai sensitiivisen.

TAULUKKO 6. rutiinidiagnostiikan ja Vitek2-laitteen antibioottiherkkyystulosten vastaavuus.

antibiootti	sama tulos (%)	Vitek2 R rutiini S (%)	Vitek2 S rutiini R (%)	RI IS Vitek2 resistentimpi (%)	RI IS rutiini resistentimpi (%)	eri tulos (%)	yhteis- lkm.
KF	61 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	61
CXM	82 (89)	0 (0)	2 (2)	5 (5)	3 (3)	10 (11)	92
CTX	61 (64)	0 (0)	16 (17)	3 (3)	16 (17)	35 (36)	96
CAZ	68 (70)	0 (0)	8 (8)	7 (7)	14 (14)	29 (30)	97
yht. (%)	272 (79)	0 (0)	26 (8)	15 (4)	33 (10)	74 (21)	346

Parhaiten tulokset vastasivat toisiaan kefalotiiniherkkyystestissä. Kefalotiinituloksista 61 eli 100 prosenttia olivat yhteneviä. Kefotaksiimiherkkyystulokset vastasivat heikokien (64 %) toisiaan. Yhteensä 79 prosenttia kaikista (n=346) antibioottiherkkyystuloksista oli yhteneviä. Eriäviä tuloksia oli yhteensä 21 prosenttia eli 74 kappaletta. Yleisesti ottaen Vitek2 antoi herkemmit tulokset verrattuna rutiinimenetelmiin. Varsinkin kefotaksiimitulokset olivat Vitek2-laitteella herkemmit; peräti 17 prosenttia tuloksista oli sensitiivisiä kun taas rutiinimenetelmillä ne olivat resistenttejä. Sellaisia tapauksia, joissa Vitek2 olisi antanut resistentin tuloksen ja rutiinimenetelmät sensitiivisen ei ollut yhtään. Intermediate-tapauksia, joissa Vitek2-laitteen antamat tulokset olivat resistentimpiä oli yhteensä neljä prosenttia. Rutiinimenetelmillä näitä tapauksia oli yhteensä kymmenen prosenttia.

Taulukossa 7 verrataan Vitek2-laitteen AST-N029 ja AST-N041 -herkkyyskorttien sekä yksittäisen AST-N041-korttiin kuuluvan ESBL-testin antamia tuloksia rutiinimenetelmillä saatuihin ESBL-tuloksiin. Testikortit tulkitsevat ESBL-tulokset sanallisesti kaikkien antibioottien perusteella kun taas erillinen AST-N041 ESBL-testi ilmoittaa tuloksen vain positiivisena tai negatiivisena. AST-N029-testikortilla saatiin 91 prosenttisesti samat tulokset kuin rutiinimenetelmillä. AST-N041-kortilla ja rutiinimenetelmillä saadut tulokset olivat 88 prosentissa tapauksista yhtenevät, mutta erillisellä AST-N041 ESBL-tunnistustestillä tämä lukema oli parempi (93 %). Eniten tuloseroja (12 %) saatiin AST-N041-testikortin ja rutiinimenetelmien välillä. Erillisellä AST-N041-kortin ESBL-testillä ja rutiinimenetelmillä saatujen tulosten välillä puolestaan oli vähiten eroja (7 %). Kolmessa tapauksessa AST-N041-testikortti ilmoitti, että antibioottiherkkyystulokset eivät sovi yhteen bakteeri-identifikaation kanssa eikä Vitek2 siksi antanut sanallista ESBL-tulosta. Nämä tapaukset heikensivät testikortin saamaa tunnistusprosenttia

verrattuna AST-N029-antibioottiherkkyyskorttiin ja irralliseen AST-N041 ESBL-testiin. Kaiken kaikkiaan eri menetelmillä saadut ESBL-testitulokset vastasivat toisiaan 91 prosenttisesti.

TAULUKKO 7. Vitek2-laitteen ja kiekkomenetelmän antamien tulosten vastaavuus ESBL-ominaisuuden osalta.

	sama tulos (%)	eri tulos (%)	yhteiskm.
AST-N029	77 (91)	8 (9)	85
AST-N041	74 (88)	10 (12)	84
AST-N041 -kortin ESBL-testi	78 (93)	6 (7)	84
yht. (%)	229 (91)	24 (9)	253

Verrattaessa Vitek2-laitteella saatuja tuloksia rutiinimenetelmien ESBL-tuloksiin, AST-N029-testikortin sensitiivisyys eli kortin herkkyys tunnistaa positiiviset kannat oli 95 %. N029-testikortin spesifisyys eli kyky ilmoittaa negatiiviset tulokset negatiivisina oli 69 %. N041-testikortin sensitiivisyys oli 91 % ja spesifisyys 100 %. N041-testikortin erillisen ESBL-varmistustestin sensitiivisyys oli 92 % ja spesifisyys 67 %.

Käytimme tutkimuksessamme kuutta ei-klassista ESBL-kantaa. Vitek2-laitetta ei ole ohjelmoitu tunnistamaan näitä ei-klassisia ESBL-kantoja, koska CLSI-standardin mukaan ESBL-kannan pitää reagoida klavulaanilahapille. AST-N029-testikortti, joka ei käytä tunnistuksessaan klavulaanihappoa ilmoitti muiden antibioottitulosten perusteella, että jokaisella kannalla oli ESBL-ominaisuus. AST-N041-testikortti, joka käyttää osana ESBL-tunnistusta klavulaanihappotestiä ilmoitti neljän näytteen kohdalla oikein, etteivät ne ole ESBL-kantoja. Kahdessa tapauksessa AST-N041-testikortti ilmoitti kannan olevan ESBL. (bioMérieux 2005b: 8 – 2.)

Lisäksi tutkimme viisi *Klebsiella oxytoca* -kantaa, joilla oli rutiinimenetelmillä tunnistettu mahdollinen K1-ominaisuus. Kumpikaan Vitek2-laitteen testikorteista ei erehtynyt ilmoittamaan näitä bakteereja ESBL-kannoiksi. AST-N041-antibioottiherkkyyskortin yksittäinen ESBL-varmistustesti antoi kuitenkin neljässä näistä tapauksista kannalle positiivisen ESBL-tuloksen.

11.4 Identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmääritysten kesto Vitek2-laitteella

Vitek2-laitteen NH-testikortti antaa aina bakteerien identifikaatiotulokset tasan kuudessa tunnissa. GN-testikortilla tulokset ovat valmiina bakteerin kasvunopeudesta riippuen 2-10 tunnissa (bioMérieux 2005b: 1 – 1). Nopein identifikaatiotulos GN-testikortilla saatiin kahdessa ja puolessa tunnissa *Escherichia coli* -kannalle. Identifikaatiotuloksen saaminen vei enintään kymmenen tuntia, jonka jälkeen laite ehdotti lisätestejä tarkemman identifikaation saamiseksi. Pseudomonasten kaltaisten gramnegatiivisten sauvojen tunnistaminen vei yleisesti ottaen muita bakteeriryhmiä enemmän aikaa (keskimäärin 6,86 tuntia), ja laite ehdottikin useammin lisätestejä identifikaation saamiseksi. Bakteerien identifikaatiotulosten saaminen GN-kortilla vei kaikilla kannoilla keskimääräisesti 5,33 tuntia. Moodi eli yleisin aika, jolloin tulokset olivat valmiina oli 4,25 tuntia.

Nopein antibioottiherkkyysmäärittäminen AST-N029-testikortilla saatiin 5,75 tunnissa. Hitain määrittäminen vei 11,5 tuntia. Tulosten saaminen vei keskimäärin 7,19 tuntia. Yleisin aika, jolloin tulokset olivat valmiina oli 6,5 tuntia. Mukana oli myös kolme näytettä, joiden tulkinta kesti epäselvän bakteeri-identifikaation vuoksi 18 tuntia. Näitä tapauksia emme ottaneet huomioon laskettaessa herkkyysmäärittäykseen kulunutta aikaa. AST-N041-testikortilla antibioottiherkkyystulokset olivat valmiina keskimäärin 6,25 tunnissa. Lyhyin aika oli 5,25 ja pisin 13 tuntia. Moodi oli 6,25 tuntia.

12 TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Suurin hankaluus tutkimuksesta saamiemme tulosten tulkinnassa oli se, ettei kaikkia käytettyjä bakteerikantoja oltu tunnistettu esimerkiksi DNA-menetelmiä hyväksi käyttäen lajitasolle asti. Vitek2-laitteen antamien tulosten luotettavuutta olisi ollut helpompi arvioida, jos meillä olisi ollut enemmän lajitasolle asti tunnistettua tutkimusmateriaalia. Varsinkin pseudomonasten kaltaisten gramnegatiivisten sauvojen tutkimustuloksia saattoi heikentää se, että vertailussa käytettiin paljon kantoja, joille oltiin rutiinimenetelmällä annettu vain todennäköinen lajinimi.

Käyttämämme antibioottiherkkyysmittausmenetelmät eivät olleet täysin vertailukelpoisia, vaikka vertasimme menetelmiä molemmille yhteisen S-I-R-luokituksen mu-

kaan. Vitek2-laite mittaa antibioottiherkkyiden minimum inhibitory concentration -menetelmän perusteella, jolle paremmin verrannollinen olisi ollut Epsilon-testi. Käyttämämme kiekkomenetelmä ei mittaa tarkkaa bakteerin kasvua estävää antibioottikon-sentraatiota vaan ainoastaan antibioottikiekon ympärille muodostuneen bakteerikasvun estorenkään halkaisijan millimetreinä. Kiekkomenetelmästä saataviin tuloksiin voivat vaikuttaa useat eri virhetekijät, jotka eivät Vitek2-laitteen herkkyysmäärityksessä tule niinkään esille. Yhtenä virhetekijänä voi olla esimerkiksi liian paksu bakteerikasvu an-tibioottiherkkyysmaljalla, jolloin mitatut millimetрилukemat ovat pienempiä. Antibioot-tien ympärille muodostuneen estorenkään halkaisijan mittaamisessa voi myös olla inhi-millisiä eroja. Paremmin tutkimusmenetelmien vertailuun sopivaa Epsilon-testiä käyte-tään kuitenkin harvoin bakteerien rutiinidiagnostiikassa.

Yleensä ennen laitteen käyttöönottoa sen toimintaa ja tulosten luotettavuutta pitäisi tarkkailla useamman päivän ajan esimerkiksi laaduntarkkailunäytteillä. Samoin silloin kun testikorttien valmistuserät vaihtuvat tai on syytä muuten epäillä tulosten luotetta-vuutta, tulisi laitteen toiminta tarkistaa. Emme tutkineet Vitek2-laitteella oikeita potilas-näytteitä, joten emme katsoneet tulosten tarkempaa seuranta tarpeelliseksi. Varmis-timme tulosten luotettavuuden bioMérieuxin suosittelemilla ATCC-laaduntarkkailukannoilla. Saimme laaduntarkkailunäytteistä oikeat tulokset, joten voimme pitää Vitek2-laitteen antamia tuloksia luotettavina.

Käytettävä tutkimusmateriaali oli kokonaisuudessaan riittävä muun muassa Vitek2-laitteen suoritusnopeuden ja ESBL-ominaisuuden tunnistamisen luotettavaa arviointia varten. Varsinkin Api20E:n ja Vitek2-laitteen testireaktioiden vertailuun riitti paljon materiaalia. Jaettuna eri bakteeriryhmiin näytemäärät olivat kuitenkin melko pienet luotettavaa identifikaatiotulosten vertailua varten. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin niin monia eri bakteerilajeja, että yksittäisten bakteerilajien kohdalla on mahdotonta sanoa, tunnistaako Vitek2 niitä luotettavasti. Rantakokko-Jalavan ym. tutkimuksessa mitattiin Vitek2-laitteen tunnistuskykyä bakteerilajeittain. Jokaista bakteerilajia oli useampi kap-pale. Opinnäytetyössämme eniten tutkittuja bakteerilajeja olivat *E. coli* ja *Klebsiella pneumoniae*, jotka Vitek2 tunnisti erittäin hyvin. Muista bakteerilajeista ei voi tehdä yksittäisiä tulkintoja.

Käytimme tutkimuksessamme pakastimeen taltioituja vanhoja potilasnäytteistä eristet-tyjä bakteerikantoja. Kasvatimme bakteerit niille sopivissa olosuhteissa Vitek2-laitteelle

suositeltavilla kasvatusalustoilla. Pakastimesta otetuista bakteereista teimme uudet puhtasviljelmät bakteerien elinkyvyn parantamiseksi. Usein tutkimamme bakteerin joukossa kasvoi myös jotain samasta potilaasta eristettyä toista bakteerikantaa, sekaflora tai ympäristöstä tullutta muuta bakteerikontaminanttia. Pyrimme saamaan tutkimamme bakteerin viljeltyä puhtasviljelmänä, jotta Vitek2-laitteen antamat tulokset olisivat olleet mahdollisimman luotettavia.

Vitek2:n laitevalmistaja suosittelee, että laitteella tutkittavat bakteerikannat olisivat alle päivän vanhoja (bioMérieux 2005a: 1 – 24, 4 – 20). Jouduimme kuitenkin kasvattamaan monia hidaskasvuisia bakteereja pari vuorokautta saadaksemme tarpeeksi bakteerimassaa suspension valmistamiseksi. Jotkut ESBL-kannat tutkimme kahden päivän vanhoina, koska tutkittavia kantoja oli niin paljon, ettemme ehtineet ajaa kaikkia näytteitä vuorokauden vanhoina. Liian vanhojen bakteerikantojen käyttö saattoi vaikuttaa Vitek2-laitteen antamiin tuloksiin, sillä vanhat bakteerit eivät aina kasva yhtä hyvin tai reagoi tunnistustesteissä yhtä herkästi.

Valmistimme bakteerisuspensiot tarkasti eri testikorteille suositeltavien vahvuuden raja-arvojen mukaan. Vähän rakeisemmista bakteeripesäkkeistä oli vaikea saada homogeenista bakteerisuspensiota aikaan. Näytteen tasaisuus on oleellinen Vitek2-laitteen oikealle toiminnalle muun muassa luotettavan transmittanssimittauksen takia ja siksi, että bakteereita jakaantuisi jokaiseen testikaivoon tarvittava määrä reaktioiden aikaansaamiseksi.

Noudatimme aineiston käsittelyssä jokaisen tutkitun bakteeriryhmän (ESBL, nonfermentatiiviset gramnegatiiset sauvabakteerit, kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit ja uudet potilasnäytelöydökset) kohdalla samanlaista tulostenkäsittelytapaa. Haimme aikaisemmat rutiinimenetelmien tulokset potilastietojärjestelmästä. Api-testien kohdalla tulokset olivat saattaneet joskus jäädä merkitsemättä tai sitten tulosten tulkinta oli ollut niin vaikeaa, että sama reaktio oltiin tulkittu usealla eri tavalla. Inhimillisiä kirjoitusvirheitä saattoi sattua sekä meille että henkilölle, joka oli kirjannut aikaisemmat tutkimustulokset. Jätimme yleensä epäselvät tapaukset taulukoinnista pois, jotta ne eivät vaikuttaisi tulosten luotettavuuteen.

Toisistaan poikkeavien tulosten käsittelyyn olisimme voineet kiinnittää enemmän huomiota, jos aika olisi riittänyt. Rantakokko-Jalavan ym. tekemässä tutkimuksessa toisistaan eroavat tulokset tarkastettiin tekemällä määritykset uudelleen sekä Vitek2-laitteella että rutiinimenetelmillä ja tarvittaessa tekemällä myös lisätestejä. Lopullinen lajimääritys saatiin sekvenoimalla. Myös Ferraron ym. ja Funken ym. tutkimuksissa oli käytetty 16S rDNA-määritystä, jolloin tulokset olivat luotettavampia. Itse emme tehneet uusinta-testejä Vitek2-laitteella. Rutiinimenetelmillä tarkastimme bakteerien identifiointia lisätesteillä vain, mikäli oli tarvetta epäillä, että pakastimeen oli talletettu väärä bakteerilaji. (Rantakokko-Jalava ym. 2006.)

13 POHDINTA

Käsittelimme työmme teoriaosuudessa opinnäytetyössämme käytettäviä bakteerilajeja. Halusimme kertoa niiden ominaisuuksista ja niille tehtävistä identifikaatiotutkimuksista tarkemmin. Tarkoituksenamme oli myös selvittää sitä, millä tavalla olemme jaotelleet käyttämämme bakteerikannat eli millaisia bakteerilajeja nonfermentatiivisiin, kasvuolosuhteiltaan vaativiin ja ESBL-ominaisuuden omaaviin bakteeriryhmiin kuuluu. Käsittelemme rutiinidiagnostiikassa käytettäviä kaupallisia bakteeri-identifikaatiomenetelmiä, koska suurin osa bakteerilajeista oli aikaisemmin tunnistettu niitä hyväksi käyttäen. Vitek2-laitteen toiminta sekä identifikaatio- ja antibioottil herkkyysmääritysmenetelmät ovat keskeinen osa työmme teoriaosua, koska työ perustuu laitteen antamien tulosten arviointiin. Opinnäytetyömme käytännönosuus koostui myös suurimmaksi osaksi näytteiden analysoinnista Vitek2-laitteella ja tulosten käsittelystä.

Opinnäytetyössämme vertasimme rutiinidiagnostiikassa käytettävien menetelmien ja Vitek2-laitteen antamia tuloksia toisiinsa. Vertailtavia kohteita olivat identifikaatio- ja antibioottil herkkyystulokset, yksittäiset testireaktiotulokset, ESBL-ominaisuuden tunnistaminen sekä identifikaatioon kulunut aika. Tutkimuksessa käytimme geenitesteillä varmistetuja *Escherichia coli* ja *Klebsiella* ESBL-kantoja sekä muita mielenkiintoisia ESBL-kantoja, nonfermentatiivisia pseudomonaksen kaltaisia gramnegatiivisia sauvoja, kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja ja uusia potilasnäytelöydöksiä. Testasimme kaikki tutkimuksessa käytettävät kannat Vitek2-laitteella. Rutiinimenetelmillä saadut tulokset etsimme HUSLABin potilastietojärjestelmästä. Eri menetelmillä saadut tulok-

set vastasivat pääosin toisiaan, mutta käyttämiemme bakteerikantojen haastavuus vaikeutti tulosten arviointia.

Identifikaatiotestitulokset olivat rutiinimenetelmillä ja Vitek2-laitteella pääosin vastaavat. Käyttämämme ESBL *E. coli* ja *Klebsiella* -kannat saivat täysin yhtenevät identifikaatiotulokset. Myös Rantakokko-Jalavan ym. vuonna 2006 tekemässä tutkimuksessa Vitek2 tunnisti kaikki *E. coli* ja *Klebsiella* -kannat oikein. Saamamme nonfermentatiivisten sauvabakteerien ja kasvuolosuhteiltaan vaativien bakteerien identifikaatiotulokset vastasivat huonommin toisiaan (noin 70 %). Funken ym. tutkimuksessa NH-kortilla tutkittujen kantojen tulokset vastasivat vertailumenetelmien tuloksia yli 13 prosenttiyksikköä omia tuloksiamme paremmin. Muilla tutkimillamme bakteerilajeilla noin 96 prosenttia identifikaatiotuloksista oli Vitek2-laitteella ja rutiinimenetelmillä yhtenevät. Verrattaessa tuloksia aikaisempiin tutkimuksiin on kuitenkin otettava huomioon muun muassa tutkittavien bakteerikantojen määrät ja erot rutiinimenetelmissä. Muissa tutkimuksissa oli esimerkiksi käytetty suurempia näytemääriä ja tarkempia tunnistusmenetelmiä.

Api20E:n ja Vitek2-laitteen antamat reaktiotulokset olivat useimpien reaktioiden kohdalla yli 90 prosenttisesti vastaavat. Ureatulokset poikkesivat eniten toisistaan. Vitek2 tulkitsi ureareaktiot helpommin positiivisiksi kuin rutiinimenetelmät. Api20NE:n ja Vitek2-laitteen antamat reaktiotulokset poikkesivat vähän enemmän toisistaan. Noin 70 prosenttia tuloksista oli samat molemmilla menetelmillä. Glukoosireaktiotulokset vastasivat huonoiten toisiaan; Vitek2 antoi usein positiivisen reaktion ja rutiinimenetelmät negatiivisen.

Kefalotiini-, kefuroksiimi-, kefotaksiimi- ja keftatsidiimiherkkyystulokset vastasivat eri menetelmillä suurimmaksi osaksi toisiaan. Parhaiten tulokset vastasivat toisiaan kefalotiiniherkkyystestissä. Rantakokko-Jalavan ym. tutkimuksessa kuitenkin juuri kefalotiiniherkkyystuloksissa oli paljon eroavaisuuksia antibioottikiekkoherkkyystestin ja Vitek2-laitteen välillä. Silloin kun saamamme antibioottiherkkyystulokset erosivat toisistaan, Vitek2-laitteen antamat tulokset olivat yleensä rutiinimenetelmiä herkempiä. Näin oli myös Rantakokko-Jalavan ym. tutkimuksessa. Yleisesti ottaen muissa tutkimuksissa Vitek2-laitteella saadut antibioottiherkkyystulokset olivat paremmat kuin meidän tutkimuksessamme.

Antibioottiherkkyyuskortit tunnistivat hyvin, noin 90 prosenttisesti, tutkittavien bakteerilajien ESBL-ominaisuuden. AST-N041-antibioottiherkkyyuskorttiin kuuluva yksittäinen ESBL-testi antoi parhaiten (93 %) rutiinimenetelmiä vastaavat tulokset. Spanun ym. ja Ferraron ym. tekemissä tutkimuksissa Vitek2-laitteen ESBL-testi tunnisti 98 % ESBL-positiivista kannoista. ESBL-testin sensitiivisyys ja spesifisyys olivat selvästi huonompia kuin näissä kahdessa muussa tutkimuksessa. Tämä ero voi osaksi johtua siitä, että kaikkia tutkimiamme ESBL-kantoja ei oltu varmistettu geenitesteillä. Tutkimuksemme selvisi, että AST-N041-antibioottiherkkyyuskortti tulkitsi AST-N029-testikorttia paremmin, etteivät ei-klassiset ESBL -kannat ole klassisia ESBL-kantoja. Kumpikaan Vitek2-laitteen testikorteista ei erehtynyt ilmoittamaan käyttämiämme viittä *Klebsiella oxytoca* K1 -kantaa ESBL-kannoiksi. Yksittäinen AST-N041-testikortin ESBL-varmistustesti antoi kuitenkin neljässä tapauksessa *Klebsiella* K1 -kannalle positiivisen ESBL-tuloksen. Spanun ym. tutkimuksessa N045-kortin ESBL-testi tulkitsi kummatkin kaksi *K. oxytoca* K1 -tuottajaa oikein ESBL-negatiivisiksi.

Identifikaatiotulokset olivat GN (Gram-Negative) -testikortilla valmiina keskimäärin 5,33 tunnissa ja NH (*Neisseria-Haemophilus*) -kortilla aina kuudessa tunnissa. Enimmillään bakteeri-identifikaatio kesti GN-testikortilla kymmenen tuntia. Rantakokko-Jalavan ym. tutkimuksessa gramnegatiivisten sauvabakteerien identifikaatio kesti GNB-testikortilla vähemmän aikaa, keskimäärin kolme tuntia. Tutkimuksemme AST-N029-testikortin tulokset olivat keskimäärin valmiina 7,19 ja AST-N041-testikortin 6,25 tunnissa. Enimmillään antibioottiherkkyytulosten saaminen kesti 13 tuntia. Rantakokko-Jalavan ym. tutkimuksessa herkkyytulosten saanti AST-N029-kortilla *Enterobacteriaceae*-kannoille kesti 6,6 tuntia ja oksidaasiposiitivisille gramnegatiivisille sauvoille 11,33 tuntia. Spanun ym. tutkimuksessa ESBL-testin tulokset olivat valmiit keskimäärin 7,5 tunnissa ja Ferraron ym. tutkimuksessa 6,3 tunnissa. Nämä tulokset olivat samansuuntaisia meidän tulostemme kanssa.

Tutkimuksemme perusteella Vitek2-laitetta voitaisiin hyvin käyttää HUSLABin bakteriologian laboratoriossa identifikaatiomäärityksiin varsinkin tutkimiemme *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvien bakteerien kohdalla. Tavallisimmat virtsaviiljelyistä löytyvät lajit kuten *Escherichia coli* ja *Klebsiella* ja niiden mahdollisen ESBL-ominaisuuden, laite tunnistaisi todennäköisesti hyvin. Vitek2 tunnisti hyvin myös tutkitut *Pseudomonas*-sukuun kuuluvat lajit. Vitek2-laitteen kykyä tunnistaa hiivoja emme tässä tutkimuksessa selvittäneet.

Nonfermentatiivisia sauvabakteereja ja kasvuolosuhteiltaan vaativia bakteereja olisi hyvä tutkia vielä opinnäytetyömme jälkeenkin kannoilla, joiden identifikaatio on esimerkiksi geenitesteillä tarkennettu lajitasolle asti. Vitek2 antoi monille tutkituille bakteerinäytteille tarkan lajitason nimen ja useissa tapauksissa tarkka lajinimi olisi ollut saatavissa tekemällä yksinkertaisia lisätesteitä. Laitteen antamalle nimelle ei kuitenkaan aina ollut vertailukohdetta, joten emme voineet tietää, oliko Vitek2:n antama nimivaihtoehto oikea. Nonfermentatiivisia sauvabakteereja tai kasvuvaatimuksiltaan vaativia bakteereja ei ole aikaisemminkaan tutkittu kovin paljoa, joten tarvetta tällaiseen tutkimukseen varmasti olisi.

Antibioottiherkkyystuloksia olisi hyvä verrata vielä lisää useammalla antibiootilla. Tässä työssä keskityimme vain Vitek2-laitteelle ja rutiinimenetelmille yhteisiin kefalosporiinituloksiin. Kefalosporiinitulokset osoittavat parhaiten, onko kyseessä ESBL-kanta. Jatkotutkimuksissa vertailukohteena olisi parempi käyttää Epsilontestiä sillä sen antamat tulokset ovat selvemmin verrattavissa Vitek2-laitteen antamiin tuloksiin kuin kiekkomenetelmän. Tutkimukset olisi myös hyvä tehdä rinnan sekä rutiinimenetelmillä että Vitek2-laitteella. Siten tutkittava bakteeri olisi varmasti molemmilla menetelmillä sama ja ylimääräisten kontaminaatioiden riski olisi pienempi. Myös pakastuksesta johtuva mahdollinen bakteerin elinkyvyn heikkeneminen estyisi.

Vitek2-laitteen antibioottiherkkyyskorteista AST-N041-testikorttia voitaisiin käyttää etukäteen seulottujen kantojen ESBL-ominaisuuden varmistukseen. Testikortissa on mukana neljännen polven kefalosporiini kefepiimi. Se lisää ESBL-varmistustestin herkkyyttä. AST-N029 -antibioottiherkkyyskortti sisältää pohjoismaiseen käyttöön soveltuvia antibiootteja gramnegatiivisille sauvabakteereille. Testikortti sopisi hyvin antibioottiherkkyysmääritysten tekoon bakteriologian laboratorion rutiinikäytössä sillä kortti huomauttaa poikkeavista herkkyytuloksista, vaikka siinä ei erillistä ESBL-varmistustestiä olekaan. (Miller 2006.)

Identifikaatio- ja antibioottiherkkyysmääritysten suoritus on helpompaa ja nopeampaa Vitek2-laitteella kuin esimerkiksi rutiinidiagnostiikassa käytettävien Api-testien ja sokeisarjojen teko. Myös tulosten tulkinta helpottuisi laitteen myötä. Erilaisten reagenssien lisäys testeihin jäisi pois ja tulosteet tulisivat suoraan paperilla. Tulokset olisi mahdollista siirtää sähköisesti suoraan potilastietojärjestelmään, jolloin käyttäjästä johtuvat

inhimilliset tulostensyöttövirheet vähenisivät. Kiekkomenetelmä on Vitek2-laitteen antibioottil herkkyysmäärittelyyn nähden taloudellisesti edullinen vaihtoehto (Hilla 2006).

Otettaessa huomioon näytteiden valmisteluun kuluneen ajan, tulokset olivat yleensä valmiina samana päivänä tai viimeistään seuraavana aamuna. Tulosten saanti oli paljon nopeampaa kuin rutiinimenetelmillä, jotka vaativat yleensä yhden tai useita yönylikasvatuksia. Saman johtopäätöksen voi tehdä, kun vertaa saamiamme Vitek2-laitteen tutkimusaikoja aikaisemmissa tutkimuksissa laskettuihin rutiinimenetelmien tutkimusaikeisiin. Rantakokko-Jalavan ym. tekemän tutkimuksen mukaan lopulliset bakteerien identifikaatio- ja herkkyystulokset olivat 70 prosentilla tutkituista kannoista valmiina ≥ 16 tuntia rutiinimenetelmiä aikaisemmin. Tutkimuksessa oltiin laskettu, että Vitek2 säästi näytteiden käsittelyaikaa noin 80 minuuttia per päivä verrattuna rutiinimenetelmiin.

Tulosten perusteella voidaan sanoa, että Vitek2-laitteella bakteerien identifikaatio- ja antibioottil herkkyystulokset saataisiin paljon rutiinimenetelmiä aikaisemmin. Varsinkin kefalosporiineille resistenttien ESBL-kantojen nopea identifikaatio- ja antibioottil herkkyystulosten saaminen olisi hyödyksi potilaiden hoitoon käytettävien mikrobilääkkeiden valinnassa. Tulosten nopeampi saaminen lisäisi myös laboratorion näytteenkäsittelykapasiteettia. Laitteesta saatava hyöty riippuisi kuitenkin bakteriologian laboratorion laajuudesta ja sen toiminnan kattavuudesta. Eniten siitä olisi hyötyä bakteriologian laboratorioissa, jotka ovat auki myöhään illalla ja antavat päivystysvastauksia myös iltaisin. Tällöin nopeasti valmistuvista tuloksista saataisiin kaikki hyöty potilaan hoitoa ajatellen. Mikäli laboratorio on auki noin kahdeksan tuntia vuorokaudessa, laitteella saadut herkkyysmäärittelytulokset eivät ehkä olisi valmiita saman työpäivän aikana. Se kuitenkin riippuu siitä kuinka aikaisin aamulla näytteet saadaan koneeseen. Esimerkiksi ESBL-näytteet etenevät seulonnan jälkeen jatkotutkimuksiin vasta myöhemmin aamupäivällä. Identifikaatiotulokset voisivat olla merkittävästi aikaisemmin valmiit laitteella kuin rutiinimenetelmillä tehdessä, mahdollisesti jo saman päivän aikana.

Mikäli HUSLAB aikoo tulevaisuudessa hankkia Vitek2-laitteen, olisi hyvä ottaa laite pidempään koekäyttöön ja selvittää, kuinka Vitek2-laite toimii tutkittaessa suurempia potilasnäytesarjoja. Silloin nähtäisiin, millä tavoin laite vaikuttaa käytännön työskentelyyn ja laitteesta koituvat mahdolliset hyödyt ja haitat tulisivat paremmin esille. Samalla selkiäisi se, mihin bakteriologisen tutkimuksen osa-alueelle laite sopisi parhaiten ja on-

ko laitteesta todellista käytännön hyötyä potilasnäytteiden diagnostiikassa bakteriologian laboratoriolle.

LÄHTEET

- ATCC The Global Bioresource Center TM 2006: About ATCC. Verkkodokumentti. <www.atcc.org/About/AboutATCC.cfm>. Luettu 2.10.2006.
- Attisha, Wally – Clark, Richard R. 1995: Introduction To Clinical Microbiology. University of Texas. Verkkodokumentti. <<http://medic.med.uth.tmc.edu>>. Luettu 23.9.2006.
- Balkwill, D. L. – Fredrickson, J. K. – Romine, M. F. 2003: *Sphingomonas* and Related Genera. The Prokaryotes – An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community Verkkodokumentti. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/314/12_00.htm>. Luettu 11.10.2006.
- Baron, Ellen Jo – Peterson, Lance R. – Finegold, Sydney M. 1994: Diagnostic Microbiology. 9th edition. Missouri: Mosby-Book 1994.
- BD 2001: CIN Agar. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.1.2001. <www.bd.com>. Luettu 10.11.2006.
- Bellais, Samuel – Naas, Thierry – Nordmann, Patrice 2001: Molecular and Biochemical Characterization of Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamase CGA-1 from *Chryseobacterium gleum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46(4). 966-970.
- bioMérieux 2004a: Api® 20 E. Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods. Tuoteselostus. Ranska: bioMérieux.
- bioMérieux 2004b : Api® 20 NE. Identification system for non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods. Tuoteselostus. Ranska: bioMérieux.
- bioMérieux 2004c: VITEK® 2 & VITEK®2 XL Integrated System Service Manual. Ranska: bioMérieux.
- bioMérieux 2005a: Vitek® 2. Instrument User Manual. USA: bioMérieux.
- bioMérieux 2005b: Vitek® 2. Product Information. USA: bioMérieux.
- bioMérieux 2005c: VITEK® 2 cards with confirmatory ESBL test. bioMérieux Connection 2(1). 1-2, 6.
- bioMérieux 2006a: VITEK® 2. General Information. Verkkodokumentti. Päivitetty 30.8.2006. <<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/microbiology/vitek2/vitek2info.htm>>. Luettu 26.10.2006.
- bioMérieux 2006b: Vitek2. Susceptibility Test Kit Analysis. Identification Test Kits and analysis. Koulutusmateriaali.
- bioMérieux 2006c: VITEK 2 NH Card. bioMérieux Connection 3(2). 1,7.

- bioMérieux SA 2006: Apiweb™. Verkkodokumentti.
<<https://apiweb.biomerieux.com>>. Luettu 4.9-29.9.2006.
- Bockemühl, Jochen – Wong, Jane D. 2003: *Yersinia*. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Pfaller, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 672-683.
- Carnahan, Amy M. – Kaplan, Raymond L. 1995: *Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas* and *Campylobacter*. Teoksessa Mahon, Connie R. – Manuselis, George Jr. (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. United States of America: W.B. Saunders Company. 491-512.
- Centers for Disease Control and Prevention 2006: *Kingella denitrificans*. Verkkodokumentti. Päivitetty 19.9.2006.
<www.cdc.gov/std/Gonorrhea/lab/Kden.htm>. Luettu 30.9.2006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2006: Welcome to Clinical and Laboratory Standards Institute. Verkkodokumentti. <www.clsi.org>. Luettu 30.10.2006.
- Curran, Diana 2006: Gardnerella. eMedicine. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.8.2006.
<<http://www.emedicine.com/med/topic841.htm>>. Luettu 11.10.2006.
- Ferraro, M. J. – Smith-Moland, E. – Procop, G. W. – Spargo, J. – Hall, G. – Tuohy, M. – Wilson, D. – Thomson, K. 2004: Clinical Evaluation of an ESBL Confirmation Test for Use with the VITEK 2® System. 44th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- Forsius, Arno 2004: Bakteerien lääkeresistenssistä. Verkkodokumentti.
<<http://www.saunalahti.fi/arnoldus/resisten.html>>. Luettu 3.3.2006.
- Fredricks, David – Ramakrishnan, Lalita 2006: The *Acetobacteraceae*: Extending the Spectrum of Human Pathogens. PLoS Pathogens. 2(4) 249-250.
- Funke, Guido – Bernard, Kathryn A. 2003: Coryneform Gram-Positive Rods. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Pfaller, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 472-501.
- Funke, G. – Desmonceaux, M. – Perrot, N. – Roger-Dalbert, C. – Bourgeois, C. – Pincus, D. – Chatellier, S. 2006: Performance of the New VITEK® 2 NH Card in a Routine Clinical Laboratory. Verkkolähde. Päivitetty 8.9.2006.
<<http://www.biomerieux-usa.com>>. Luettu 21.10.2006.
- Gilligan, Peter H. – Lum, Gary – Vandamme, Peter A. R. – Whittier, Susan 2003: *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandorea*, and *Acidovorax*. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Pfaller, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 729-748.

- Goessens, Wil 2004: Resistance mechanism detection and "AES". Presentations of The Nordic User Meeting for BacT/ALERT® and VITEK 2®. Erasmus University Medica Center Rotterdam. Ranska: bioMérieux.
- von Graevenitz, Alexander – Zbinden, Reinhard – Mutters, Reinier 2003: *Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurella*, and Other Fastidious or Rarely Encountered Gram-Negative Rods. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Tenover, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 609-622.
- Hall, Gerri S. 1995: Nonfermenting Gram-Negative Bacilli and Miscellaneous Gram-Negative Rods. Teoksessa Mahon, Connie R. – Tenover, George Jr. (toim.): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. United States of America: W.B. Saunders Company. 513-538.
- Health Protection Agency 2006: Fact Sheet. Verkkodokumentti. Päivitetty 7.8.2006. <www.hpa.org.uk/cfi/lhcai/factsheet_pseudomonads.htm>. Luettu 10.10.2006.
- Hilla, Risto 2006: Laboratoriohoitaja. HUSLAB klinisen mikrobiologian laboratorio. Bakteriologian osasto. Haastattelu: 15.5.2006-10.11.2006.
- Huovinen, Pentti – Vaara, Martti – Liippo, Kari – Viljanen, Matti 2003: Bakterilääkkeet. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja II. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 81-151.
- HUSLAB Bakteriologian osasto 2003: Kasvatusatmosfäärit: Normaali-, CO₂-, anaerobi- ja kampakasvatusatmosfääri. Työohje. Versio 1.10.
- HUSLAB Bakteriologian osasto 2004: ESBL-viljely. Työohje. Versio 1.30. Tarkastettu 3.9.2004.
- HUSLAB Bakteriologian osasto 2005: Gramnegatiivisten sauvojen tunnistus. Työohje. Versio 1.40. Tarkastettu 2.2.2005.
- HUSLAB Bakteriologian osasto 2006: ESBL-testaukset. Työohje. Versio 3.00. Tarkastettu 6.4.2006
- Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2000: Laboratorion analyysitekniikka. 3. painos. Helsinki: Oy Edita Ab.
- Janda, William M. – Knapp, Joan S. 2003: *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Tenover, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 585-608.

- Kansanterveyslaitos (KTL). Mikrobiologian laboratorio (MIEL) 2006: Laajakirjoiset β -laktamaasit (ESBL). Verkkodokumentti. Päivitetty 8.3.2006.
<http://www.ktl.fi/attachments/suomi/osastot/bato/esbl_taustaa.pdf>.
Luettu 23.9.2006.
- Kasper, Dennis L. – Barlam, Tamar F. 2005: Infections Due to HACEK Group and Miscellaneous Gram-Negative Bacteria. Teoksessa Kasper, Dennis L. – Fauci, Anthony S. – Longo, Dan L. – Braunwald, Eugene – Hauser, Stephen L. – Jameson, J. Larry (toim.): Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th edition. New York: McGraw-Hill. 867-870.
- Kelly, Mirabelle – Sinave, Christian P. 2005: HACEK Group Infections. WebMD. Verkkodokumentti. Päivitetty 7. 6. 2005.
<www.emedicine.com/med/topic935.htm>. Luettu 11.8.2006.
- Kilian, Mogens 2003: Haemophilus. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Tenover, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 623-635.
- Kiska, Deanna L – Gilligan, Peter H. 2003: *Pseudomonas*. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Tenover, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 719-728.
- Long, Karen S. – Thomas, John G. – Barnishan, Jean 1995: *Neisseria*. Teoksessa Mahon, Connie R. – Manuselis, George Jr. (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. United States of America: W.B. Saunders Company. 391-415.
- Maa- ja metsätalousministeriö 2005: Kampylobakteerit. Verkkodokumentti. Päivitetty 14.3.2005. <<http://www.bmm.fi/el/art/taudit/tau/kam.html>>. Luettu 11.10.2006.
- Mahon, Connie R. – Manuselis, George Jr. 1995: *Enterobacteriaceae*. Teoksessa Mahon, Connie R. – Manuselis, George Jr. (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. United States of America: W.B. Saunders Company. 447-490.
- Manuselis, George Jr. – Barnishan, Jean – Scheicher, Leonard H. 1995: *Haemophilus* and Other Fastidious Gram-Negative Rods. Teoksessa Mahon, Connie R. – Manuselis, George Jr. (toim.): Textbook of Diagnostic Microbiology. United States of America: W.B. Saunders Company. 418-445.
- Marcel, Jean-Pierre 2004: Vitek 2 MIC Determination. Presentations of The Nordic User Meeting for BacT/ALERT® and VITEK 2®. Ranska: bioMérieux.
- Mast Diagnostics 2006: MASTDISCS™ ID Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Detection Discs. Verkkodokumentti. <www.mastgrp.com>. Luettu 27.10.2006.
- Meurman, Olli 2005: ESBL. Suomen sairaalahygienialehti. 23(2). 71-79.

- Miller, James R. 2005: *Morganella Infections*. eMedicine. Verkkodokumentti. Päivitetty 30.6.2005. <www.emedicine.com/med/byname/morganella-infections.htm>. Luettu 31.10.2006.
- Miller, Juha 2006. Tuotespesialisti. bioMérieux Suomi Oy. Haastattelu 5.9.2006-10.11.2006.
- Moore, John E. – McCalmont, Mark – Xu, Jiru – Millar, B. Cherie – Heaney, Neville 2002: *Asaia* sp., an Unusual Spoilage Organism of Fruit-Flavoured Bottled Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8). 4130-4131.
- Motwani, Bharat – Krezolek, Dorota – Symeonides, Simon – Khayr, Walid 2004: *Myroides odoratum* Cellulitis and Bacteremia: A Case Report. *Infectious Diseases in Clinical Practise*. 12(6). 343-344.
- Nachamkin, Irving 2003: *Campylobacter* and *Arcobacter*. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Tenover, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 902-914.
- Nauschuetz, William F. – Kwa, Boo H. – Pentella, Michael A. 1995: Sexually Transmitted Diseases. Teoksessa Mahon, Connie R. – Manuselis, George Jr. (toim.): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. United States of America: W.B. Saunders Company. 971-982.
- Oxoid 2006: Oxoid Combination Disk Range. Verkkodokumentti. Päivitetty 26.10.2006. <www.oxoid.com>. Luettu 27.10.2006.
- Paqniez, H. – Berche, P. 2005: Opportunistic infections caused by *Shewanella*, new emergent bacteria. PubMed. Verkkodokumentti. <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Luettu 10.10.2006.
- Penttilä, Ilkka (toim.) 2004: *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Porvoo: WSOY.
- Pérez-Vázquez – Oliver – Sánchez del Saz – Loza – Baquero – Cantón 2000: Performance of the VITEK2 system for identification and susceptibility testing of routine *Enterobacteriaceae* clinical isolates. Verkkodokumentti. <www.sciencedirect.com/science>. Luettu 20.5.2006.
- Pincus, David H. 2006: Microbial identification using the Biomérieux Vitek®2 system. BioMérieux. Verkkodokumentti. Päivitetty 7.6.2006. <<https://store.pda.org/bookstore/TableOfContents>>. Luettu 10.8.2006.
- Puohimiemi, Ritvaleena 2006: *Sairaalamikrobiologi*. HUSLAB klinisen mikrobiologian laboratorio. Bakteriologian osasto. Haastattelu: 1.7-10.11.2006.
- Rantakokko-Jalava, Kaisu – Elo-Lehtonen, Eija – Meurman, Olli 2006: Comparison of workflow and accuracy of identification and antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and enterococci by Vitek 2 and routine methods. *APMIS* 114(1). 43-47.

- Standards Unit. Evaluations and Standards Laboratory 2005a: Identification of glucose non-fermenting rods. Guidance Note. National Standard Method.
- Standards Unit. Evaluations and Standards Laboratory 2005b: Identification of *Haemophilus* species and the HACEK-group of organism. Guidance Note. National Standard Method.
- Standards Unit. Evaluations and Standards Laboratory 2005c: Laboratory detection and reporting of bacteria with extended spectrum β -lactamases. Guidance Note. National Standard Method.
- Stelzmueller, I. – Biebl, M. – Wiesmayr, S. – Eller, M. – Hoeller, E. – Fille, M. – Weiss, G. – Lass-Floerl, C. – Bonatti, H 2006: *Ralstonia pickettii* - innocent bystander or a potential threat? Clinical Microbiology & Infection. 12(2). 99-101.
- Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä –Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe) 2003: Bakteriryhmäkohtaiset kommentit. Verkkodokumentti.
<www.ktl.fi/extras/fire/Liite%205.pdf>. Luettu 3.3.2006.
- Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä –Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe) 2005: Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. Versio 4.
- Thomson, Richard B. Jr. – Miller, Michael J. 2003: Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. Teoksessa Murray, Patrick R. – Baron, Ellen Jo – Jorgensen, James H. – Pfaller, Michael A. – Tenover, Robert H. (toim.): Manual of Clinical Microbiology. Volume 1. 8th edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 286-330.
- Tissari, Päivi – Anttila, Veli-Jukka 2003a: Muu *Enterobacteriaceae*-heimo. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 192-194.
- Tissari, Päivi – Anttila, Veli-Jukka 2003b: Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 195-202.
- Tissari, Päivi – Anttila, Veli-Jukka 2005: Pseudomonakset, pseudomonaksen kaltaiset sauvat ja akinetobakteerit. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 195-202.
- U.S. Food and Drug Administration 2006: About the Food and Drug Administration. Verkkodokumentti. Päivitetty 4.11.2006.
<www.fda.gov/opacom/hpview.html>. Luettu 6.11.2006.

- Vaara, Martti 2005: Bakterilääkeresistenssi eilen, tänään ja huomenna Osa II. Verkko-dokumentti. <www.hus.fi>. Luettu 19.9.2006.
- Vuoto, Risto – Kujala, Pekka 2003: Muita gramnegatiivisia bakteereja. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vahe-ri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kir-ja I. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 203-210.
- Vuoto, Risto – Rostila, Timo 2003: *Neisseria gonorrhoeae*. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vahe-ri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. 1. pai-nos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 157-159.

VITEK2-LAITTEEN IDENTIFIKAATIOTULOSTE

Date: 09/08/2006 16:02:37
WSVT2-R04.02

bioMerieux
Vitek 2 Lab Report

Page: 1
automatic

Accession ID: [REDACTED]

LSN configured for demoless operation.

Position: (00000E870002) HUSLAB VITEK2 -01 Sep 08 11:43:19

Type: Gram Negative Identification

Status: FINAL (04.25)

Organism: Escherichia coli

Origin: GN Identification

APPA	-	ADO	-	PyrA	-	lARL	-	dCEL	-	BGAL	+
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-	dGLU	+	GGT	-	OFF	+
BGLU	-	dMAL	+	dMAN	+	dMNE	+	BXYL	-	BAlap	-
ProA	-	LIP	-	PLE	-	TyrA	-	URE	-	dSOR	+
SAC	+	dTAG	-	dtRE	+	CIT	-	MNT	-	5KG	-
lLATk	+	AGLU	-	SUCT	-	NAGA	-	AGAL	+	PHOS	-
GlyA	-	ODC	+	LDC	+	lHISa	-	CMT	+	BGUR	+
O129R	+	GGAA	-	lMLTa	-	ELLM	-	lLATa	-		

Confidence Level: Excellent Identification

Probability	Organism
99.00	Escherichia coli

LOT 241010840 EXP DATE 01-Apr-2007 (2410 1084 0123 5756)
[iwfn awfo dilP inc04:12:55 ver0169]

VITEK2-LAITTEEN ANTIBIOOTTIHERKKYYSTULOSTE

Date: 09/11/2006 08:53:12
WSVT2-R04.02

bioMerieux
Vitek 2 Lab Report

Page: 1
automatic

Accession ID: XXXXXXXXXX
Position: LSN configured for demoless operation.
(00000E870002) HUSLAB VITEK2 -02 Sep 08 11:43:19
Type: Gram Negative Susceptibility - AST-N029
Status: FINAL (07.50)
Organism: Escherichia coli
Origin: AST-N029 Identification (2410 1084 0123 5756)

	Vitek 2		Expert		Final	
Amoxicillin/Clavulanic Acid	16	I *	16	*I	16	I
Ampicillin	>=32	R *	>=32	*R	>=32	R
Aztreonam	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Cefalotin	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Cefotaxime	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Cefotaxime	16	I *	16	*I	16	I
Cefpirome	16	I *	16	*R	16	R
Cefpodoxime	>=8	R *	>=8	*R	>=8	R
Ceftazidime	16	I *	16	*R	16	R
Cefuroxime	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Cefuroxime Axetil	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Ciprofloxacin	>=4	R *	>=4	*R	>=4	R
Gentamicin	2	S *	2	*S	2	S
Mecillinam	2	S *	2	*S	2	S
Meropenem	<=0.25	S *	<=0.25	*S	<=0.25	S
Nalidixic Acid	>=32	R *	>=32	*R	>=32	R
Nitrofurantoin	<=16	S *	<=16	*S	<=16	S
Piperacillin/Tazobactam	8	S *	8	*S	8	S
Tobramycin	>=16	R *	>=16	*R	>=16	R
Trimethoprim	<=0.5	S *	<=0.5	*S	<=0.5	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<=20	S *	<=20	*S	<=20	S

- Advanced Expert Findings -

Expert findings: Susceptibility results fully consistent with the organism identification.

- Suggested Antibigram Correction -

Therapeutic interpretation suggests corrections to:

CEFTAZIDIME
CEFPIROME

- Expert Summary -

Phenotype match: VERY TYPICAL
Frequency in this context: RARE
Escherichia coli
BETA-LACTAMS

Recognized phenotypes:
EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE

Phenotype match: VERY TYPICAL
Frequency in this context: RARE

AMINOGLYCOSIDES

Recognized phenotypes:
RESISTANT (AAC(6'))

Date: 09/11/2006 08:53:12
WSVT2-R04.02

bioMerieux
Vitek 2 Lab Report

Page: 2
automatic

Accession ID: [REDACTED]

LSN configured for demoless operation.

Position: (00000E870002) HUSLAB VITEK2 -02 Sep 08 11:43:19

Type: Gram Negative Susceptibility - AST-N029

Phenotype match: VERY TYPICAL

Frequency in this context: RARE

QUINOLONES

Recognized phenotypes:

RESISTANT

Phenotype match: VERY TYPICAL

Frequency in this context: COMMON

FURANES

Recognized phenotypes:

WILD

Phenotype match: VERY TYPICAL

Frequency in this context: VERY FREQUENT

TRIMETHOPRIM

Recognized phenotypes:

WILD

Phenotype match: VERY TYPICAL

Frequency in this context: VERY FREQUENT

TRIMETHOPRIM/SULFONAMIDES

Recognized phenotypes:

WILD

Phenotype match: VERY TYPICAL

Frequency in this context: VERY FREQUENT

Associations of resistance mechanisms:

Escherichia coli

Association:

AMINOGLYCOSIDES

RESISTANT (AAC(6'))

Frequency in this context: VERY FREQUENT

Association:

BETA-LACTAMS

EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE

AMINOGLYCOSIDES

RESISTANT (AAC(6'))

Frequency in this context: VERY FREQUENT

LOT 151021740 EXP DATE 19-Jul-2007 (1510 2174 0100 0232)

Parameter Set 'HUSLAB'

[iwfN awfO HUSLAB dila inc07:27:04 ver0169]

MIC values in mcg/ml

Date: 09/11/2006 08:53:23
WSVT2-R04.02

bioMerieux
Vitek 2 Lab Report

Page: 1
automatic

Accession ID: XXXXXXXXXX
 Position: LSN configured for demoless operation.
 (00000E870002) HUSLAB VITEK2 -03 Sep 08 11:43:19
 Type: Gram Negative Susceptibility - AST-N041
 Status: FINAL (06.75)
 Organism: Escherichia coli
 Origin: AST-N041 Identification (2410 1084 0123 5756)

	Vitek 2		Expert		Final	
Amikacin	16	S *	16	*S	16	S
Amoxicillin/Clavulanic Acid	16	I *	16	*I	16	I
Ampicillin	>=32	R *	>=32	*R	>=32	R
Cefazolin	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Cefepime	8	S *	8	*R	8	R
Cefotaxime	>=64	R *	>=64	*R	>=64	R
Cefoxitin	16	I *	16	*I	16	I
Ceftazidime	16	I *	16	*R	16	R
Ciprofloxacin	>=4	R *	>=4	*R	>=4	R
ESBL	POS	+	POS	+	POS	+
Gentamicin	2	S *	2	*S	2	S
Imipenem	<=1	S *	<=1	*S	<=1	S
Netilmicin	>=32	R *	>=32	*R	>=32	R
Nitrofurantoin	<=16	S *	<=16	*S	<=16	S
Norfloxacin	>=16	R *	>=16	*R	>=16	R
Piperacillin	>=128	R *	>=128	*R	>=128	R
Piperacillin/Tazobactam	8	S *	8	*S	8	S
Tetracycline	>=16	R *	>=16	*R	>=16	R
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<=20	S *	<=20	*S	<=20	S

- Advanced Expert Findings -
 Expert findings: Susceptibility results fully consistent with the organism identification.

- Suggested Antibigram Correction -
 Therapeutic interpretation suggests corrections to:
 CEFTAZIDIME
 CEFEPIME

- Expert Summary -
 Phenotype match: VERY TYPICAL
 Frequency in this context: RARE
 Escherichia coli
 BETA-LACTAMS
 Recognized phenotypes:
 EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
 Phenotype match: VERY TYPICAL
 Frequency in this context: RARE
 AMINOGLYCOSIDES
 Recognized phenotypes:
 RESISTANT (AAC(6'))
 Phenotype match: VERY TYPICAL
 Frequency in this context: RARE

Date: 09/11/2006 08:53:23
WSVT2-R04.02

bioMerieux
Vitek 2 Lab Report

Page: 2
automatic

Accession ID: [REDACTED]
LSN configured for demoless operation.
Position: (00000E870002) HUSLAB VITEK2 -03 Sep 08 11:43:19
Type: Gram Negative Susceptibility - AST-N041

QUINOLONES

Recognized phenotypes:
RESISTANT
Phenotype match: VERY TYPICAL
Frequency in this context: COMMON

FURANES

Recognized phenotypes:
WILD
Phenotype match: VERY TYPICAL
Frequency in this context: VERY FREQUENT

TETRACYCLINES

Recognized phenotypes:
RESISTANT
Phenotype match: VERY TYPICAL
Frequency in this context: VERY FREQUENT

TRIMETHOPRIM/SULFONAMIDES

Recognized phenotypes:
WILD
Phenotype match: VERY TYPICAL
Frequency in this context: VERY FREQUENT

Associations of resistance mechanisms:

Escherichia coli

Association:
TETRACYCLINES
RESISTANT
Frequency in this context: VERY FREQUENT

Association:
AMINOGLYCOSIDES
RESISTANT (AAC(6'))
Frequency in this context: VERY FREQUENT

Association:
BETA-LACTAMS
EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
TETRACYCLINES
RESISTANT
Frequency in this context: RARE

Association:
BETA-LACTAMS
EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE
AMINOGLYCOSIDES
RESISTANT (AAC(6'))
Frequency in this context: VERY FREQUENT

LOT 163022440 EXP DATE 26-Jul-2007 (1630 2244 0121 2458)
Parameter Set 'HUSLAB'

[iwfn awfo HUSLAB dila inc06:41:58 ver0169]
MIC values in mcg/ml

KÄYTETYT BAKTEERIKANNAT

GN-kortilla tunnistettuja kantoja yhteensä 144.

Escherichia coli n 68

Rutiini ID	Vitek2 ID	Vitek2 ID %	Laite ehdottaa lisätestejä	Vastavuus	Vitek2 ID (h)
Coliformi-sauva	<i>Escherichia coli</i>	96,68		3	4,75
Coliformi-sauva	<i>Escherichia coli</i>	93,00		3	6,75
Coliformi-sauva	<i>Escherichia coli</i>	93,24		3	7,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	96,99		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	94,03		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	3,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	2,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,86		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	7,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	97,54		1	6,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	2,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	2,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,66		1	2,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	3,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	91,93		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	93,50		1	8,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	93,90		1	6,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,29		1	5,00

KÄYTETYT BAKTEERIKANNAT

<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	94,34		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	97,12		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,86		1	6,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	3,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	97,37		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	90,19		1	8,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,66		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	89,43		1	7,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	93,33		1	9,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,86		1	6,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,66		1	4,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	92,00		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	94,07		1	5,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,86		1	6,25
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	94,56		1	7,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98,86		1	6,00
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	95,00		1	4,50
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	99,00		1	2,75
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	89,60		1	7,00

0 = eriävät tulokset	0
1 = vastaavat tulokset	65
2 = olisi mahdollisesti tunnistanut oikein lisätestien avulla	0
3 = rutiinimenetelmillä epäselvät tulokset	3
- = ei kuulu identifikaatiokortin testivalikkoon	0
yhteensä	68

Rutiini ID	Vitek2 ID	Vitek2 ID %	Laite ehdottaa lisätestejä	Vastavuus	Vitek2 ID (h)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,00		1	4,50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,00		1	3,75
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,00		1	4,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,55		1	4,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,00		1	3,25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,55		1	3,75
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,55		1	3,75
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,00		1	4,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1. <i>Raoultella ornithinolytica</i> 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1. 50,28 2. 49,72	X	0	10,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,55		1	4,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	unidentified			0	7,75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96,70		1	6,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,00		1	4,25

0 = eriävät tulokset	2
1 = vastaavat tulokset	29
2 = olisi mahdollisesti tunnistanut oikein lisätestien avulla	0
3 = rutiinimenetelmillä epäselvät tulokset	0
- = ei kuulu identifikaatiokortin testivalikkoon	0
yhteensä	31

KÄYTETYT BAKTEERIKANNAT

Pseudomonakset ja sen kaltaiset nonfermentatiiviset gramnegatiiviset sauvabakteerit n 41

Rutiini ID	Vitek2 ID	Vitek2 ID %	Laite ehdottaa lisätestejä	Vastaus vuus	Vitek2 ID (h)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	91,30		1	8,00
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,00		1	5,00
<i>Asaia bogorensis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> group	87,04	X	-	5,25
<i>Asaia bogorensis</i>	1. <i>Shigella</i> group 2. <i>Escherichia coli</i>	1. 50,28 2. 49,72	X	-	9,75
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> group	95,00	X	1	5,00
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	99,00		1	5,00
<i>Comomonas/Pseudomonas Alcaligenes/P. stutzeri</i>	Inconclusive identification			0	9,75
<i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Myroides</i> spp.	95,00		-	7,75
<i>Flavobacterium</i> -laji	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	99,00		-	4,50
Gram. neg. sauva (<i>Chryseomonas</i>)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99,00		-	4,25
Gram. neg. sauva (lähinnä <i>Acinetobacter</i> -laji)	<i>Morganella morganii</i>	99,00		0	6,00
Gram. neg. sauva (lähinnä <i>Myroides</i> -laji)	<i>Myroides</i> spp.	98,97		1	5,75
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Chryseobacterium indologenes</i>)	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99,00		1	6,00
Pseud. kalt. neg. sauva	1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1. 33,58 2. 33,58 3. 32,84	X	3	9,75
Pseud. kalt. neg. sauva	<i>Myroides</i> spp.	98,97		3	5,25
Pseud. kalt. neg. sauva	<i>Acinetobacter junii</i>	96,74		3	7,75
Pseud. kalt. neg. sauva	1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2. <i>Pseudomonas putida</i>	1. 50,26 2. 49,74	X	3	7,75
Pseud. kalt. neg. sauva	<i>Brevundimonas diminuta/vesicularis</i>	97,95	X	3	7,75
Pseud. kalt. neg. sauva (<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)	1. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ssp. <i>detrificans</i> 2. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ssp. <i>xylosoxidans</i>	1. 50,25 2. 49,75	X	1	9,75
Pseud. kalt. neg. sauva (<i>Brevundimonas</i> tai <i>Spingomonas</i> -laji)	1. <i>Myroides</i> spp. 2. <i>Brevundimonas diminuta/vesicularis</i>	1. 50,51 2. 49,49	X	3	9,75

KÄYTETYT BAKTEERIKANNAT

Pseud. kalt. neg. sauva (<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>)	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	99,00		1	4,25
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Alcaligenes</i> tai sen kaltainen laji)	<i>Delftia acidovorans</i>	95,00		0	9,75
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Alcaligenes</i> -laji)	1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1. 33,58 2. 33,58 3. 32,84	X	-	9,75
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Bergeyella zoohelcum</i>)	1. <i>Brevundimonas diminuta/vesicularis</i> 2. <i>Myroides</i> spp.	1. 50,26 2. 49,74	X	-	9,75
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Brevundimonas vesicularis</i>)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	94,29		0	6,50
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Chryseobacterium indologenes</i>)	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99,00		1	5,00
Pseud.kalt.neg.sauva (lähinnä <i>Myroides</i> -laji)	<i>Myroides</i> spp.	98,97		1	6,25
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Ochrobactrum anthropi</i>)	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99,00		1	4,00
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Oligella urethralis</i>)	1. <i>Acinetobacter lwoffii</i> 2. CDC group EF-4 (<i>Pasteurella</i>) 3. <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1. 33,45 2. 33,45 3. 33,10	X	-	9,75
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>P. luteola</i>)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97,81		0	6,75
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>P. putida</i>)	<i>Pseudomonas putida</i>	99,00		1	7,00
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Ralstonia pickettii</i>)	<i>Pseudomonas mendocina</i>	98,91		0	7,00
Pseud. kalt. neg. sauva (lähinnä <i>Sphingobacterium</i> -laji)	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	99,00		0	6,00
Pseud. kalt. neg. sauva (<i>Shewanella putrefaciens</i>)	<i>Shewanella putrefaciens</i>	94,31		1	5,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,45		1	5,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,24		1	5,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	95,00		1	6,00
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	99,00		1	6,75
<i>Pseudomonas</i> -laji	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	89,72		1	9,75
<i>Pseudomonas</i> -laji (<i>P. fluorescens/putida</i>)	<i>Pseudomonas putida</i>	99,00		1	6,75
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	98,16		1	3,75

KÄYTETTYT BAKTEERIKANNAT

0 = eriävät tulokset	7
1 = vastaavat tulokset	20
2 = olisi mahdollisesti tunnistanut oikein lisätestien avulla	0
3 = rutiinimenetelmillä epäselvät tulokset	6
- = ei kuulu identifikaatiokortin testivalikkoon	8
yhteensä	41

KÄYTETTYT BAKTEERIKANNAT

Muut n 4

Rutiini ID	Vitek2 ID	Vitek2 ID %	Laite ehdottaa lisätestejä	Vastaa vuus	Vitek2 ID (h)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	98,29	X	1	4,50
<i>Citrobacter</i> -laji	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	93,00		1	5,00
<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>	99,00		1	6,00
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	97,00		1	5,00

0 = eriävät tulokset	0
1 = vastaavat tulokset	4
2 = olisi mahdollisesti tunnistanut oikein lisätestien avulla	0
3 = rutiinimenetelmillä epäselvät tulokset	0
- = ei kuulu identifikaatiokortin testivalikkoon	0
yhteensä	4

KÄYTETTYT BAKTEERIKANNAT

NH-kortilla tunnistettuja kantoja yhteensä 41.

Kasvuolosuhteiltaan vaativat bakteerit n 41

Rutiini ID	Vitek2 ID	Vitek2 ID %	Laite ehdottaa lisätestejä	Vastaa vuus	Vitek2 ID (h)
<i>Campylobacter coli</i>	1. <i>Campylobacter coli</i> 2. <i>Campylobacter jejuni</i>	1. 50,00 2. 50,00	X	2	6,00
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Campylobacter coli</i>	99,00		0	6,00
<i>Campylobacter jejuni</i>	1. <i>Campylobacter jejuni</i> 2. <i>Campylobacter coli</i>	1. 50,53 2. 49,47	X	2	6,00
<i>Campylobacter jejuni</i>	1. <i>Campylobacter jejuni</i> 2. <i>Campylobacter coli</i>	1. 50,58 2. 49,42	X	2	6,00
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	98,39		1	6,00
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	96,86		1	6,00
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	96,86		1	6,00
<i>Campylobacter</i> -laji	1. <i>Neisseria cinerea</i> 2. <i>Neisseria meningitidis</i> 3. <i>Kingella denitrificans</i>	1. 33,82 2. 33,09 3. 33,09	X	0	6,00
<i>Campylobacter</i> -laji	1. <i>Campylobacter coli</i> 2. <i>Campylobacter jejuni</i>	1. 50,52 2. 49,48	X	1	6,00
<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Capnocytophaga</i> spp.	99,00		1	6,00
<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Capnocytophaga</i> spp.	99,00		1	6,00
<i>Capnocytophaga</i> -laji (lähinnä <i>C. canimorsus</i>)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	90,81		0	6,00
<i>Cardiobacterium hominis</i>	<i>Cardiobacterium hominis</i>	96,54		1	6,00
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	99,00		1	6,00
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	95,00		1	6,00
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	92,00		1	6,00
<i>Haemoph. kalt. neg. sauva</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	92,00		3	6,00
<i>Haemophilus actinomycecomitans</i>	<i>Haemophilus actinomycecomitans</i>	94,33		1	6,00
<i>Haemophilus aphrophil</i>	<i>Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus</i>	93,86	X	1	6,00
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	97,55		1	6,00
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	95,00		1	6,00
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	93,97		1	6,00
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Unidentified			0	6,00
<i>Haemophilus</i> -laji	Nonreactive biopattern			0	6,00
<i>Haemophilus</i> -laji (lähinnä <i>paraphrophilus</i>)	<i>Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus</i>	91,21	X	1	6,00
<i>Haemophilus</i> -laji (lähinnä <i>paraphrophilus/aphrophilus</i>)	<i>Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus</i>	95,00	X	1	6,00
<i>Kingella kingae</i>	<i>Kingella kingae</i>	99,00		1	6,00
<i>Kingella</i> -laji	<i>Neisseria sicca</i>	99,00		-	6,00

KÄYTETYT BAKTEERIKANNAT

Lähinnä <i>Eikenella corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	99,00		1	6,00
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1. <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> 2. <i>Neisseria cinerea</i>	1. 50,53 2. 49,47	X	2	6,00
<i>Moraxella nonliquefa</i>	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	99,00		-	6,00
<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	91,33		-	6,00
<i>Moraxella</i> -laji (ei <i>catarrhalis</i>)	<i>Neisseria sicca</i>	99,00		-	6,00
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	99,00		1	6,00
<i>Neisseria weaveri</i>	<i>Neisseria elongata</i>	99,00		-	6,00
<i>Neisseria</i> -laji (lähinnä <i>N. elongata</i>)	1. <i>Kingella denitrificans</i> 2. <i>Neisseria elongata</i> 3. <i>Neisseria cinerea</i>	1. 33,56 2. 33,56 3. 32,88	X	2	6,00
<i>Neisseria</i> -laji (lähinnä <i>N. lactamica</i>)	<i>Neisseria lactamica</i>	91,29		1	6,00
<i>Neisseria</i> -laji (lähinnä <i>N. sicca/subflava</i>)	<i>Neisseria sicca</i>	98,39		1	6,00
<i>Pasteurella canis</i>	Unidentified			-	6,00
<i>Pasteurella multocida</i>	Unidentified			-	6,00
<i>Pasteurella</i> -laji (lähinnä <i>P. dagmatis</i>)	1. <i>Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus</i> 2. <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1. 50,28 2. 49,72	X	-	6,00

0 = eriävät tulokset	5
1 = vastaavat tulokset	22
2 = olisi mahdollisesti tunnistanut oikein lisätestien avulla	5
3 = rutiinimenetelmillä epäselvät tulokset	1
- = ei kuulu identifikaatiokortin testivalikkoon	8
yhteensä	41